

# Análisis molecular de factores asociados al éxito del patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii*: Resistencia, transferencia génica y virulencia

Carlos Rumbo Lorenzo

---

Tesis doctoral

Octubre 2014

**Directores:** Dr. Germán Bou Arévalo y Dra. M<sup>a</sup> del Mar Tomás Carmona

**Tutor:** Isaac Fuentes Boquete

Servicio de Microbiología-Instituto de Investigación Biomédica A Coruña  
Complejo Hospitalario Universitario A Coruña



UNIVERSIDADE DA CORUÑA





Los directores de esta tesis doctoral, D. Germán Bou Arévalo, Doctor en Ciencias Biológicas, Jefe del Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), Director del área de Microbiología del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) y Profesor Asociado de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela (USC), y Dña. María del Mar Tomás Carmona, Doctora en Medicina, Investigadora Miguel Servet del INIBIC y Coordinadora de la Unidad de Diagnóstico Genómico del Servicio de Microbiología (CHUAC).

**CERTIFICAN:**

Que D. Carlos Rumbo Lorenzo, Licenciado en Biología por la Universidad de A Coruña, ha realizado en el Servicio de Microbiología y en el Instituto de Investigación Biomédica (INIBIC) del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, bajo su dirección y tutela el trabajo **“Análisis molecular de factores asociados al éxito del patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii*: Resistencia, transferencia génica y virulencia”**, el cual reúne todas las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en A Coruña, 1 de Octubre, 2014,

Dr. Germán Bou Arévalo

**Director**

Dra. María del Mar Tomás Carmona

**Directora**



D. Isaac Fuentes Boquete, profesor del Departamento de Medicina de la facultad de Ciencias de la Salud, en la Universidad de A Coruña,

**CERTIFICA:**

Que D. Carlos Rumbo Lorenzo, Licenciado en Biología por la Universidad de A Coruña, ha realizado en el Servicio de Microbiología y en el Instituto de Investigación Biomédica (INIBIC) del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, bajo su tutela el trabajo **“Análisis molecular de factores asociados al éxito del patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii*: Resistencia, transferencia génica y virulencia”**, el cual reúne todas las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en A Coruña, 1 de Octubre, 2014.

Dr. Isaac Fuentes Boquete

**Tutor**



# Agradecimientos

---

Son muchas las personas a las que tengo que agradecer el que haya llegado aquí, y que, de alguna manera, ayudaron a que haya terminado esta tesis doctoral.

En primer lugar, agradecer a mis dos directores de tesis, Germán y Mariki, el haberme dado la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación, y haber confiado en mí en todo momento. También a mi tutor, Isaac, que me ayudó de buen grado en las gestiones, y a mi excodirector, Esteban, por su apoyo inicial.

Agradezco también al Instituto de Salud Carlos III la financiación concedida durante la práctica totalidad de mi tesis.

Mención especial merecen mis compañeros de laboratorio. Eva, María López, Patri, Álex, Marta, Astrid, Meri, Laura, Soraya, Clara, Anita, Juan, Marga, Míriam, María, Jose... Cómo olvidar esos días en el laboratorio, esas fiestas, esos viajes... Con ellos me he divertido, he aprendido y, gracias a ellos, soy mejor científico y mejor persona. Imposible tener unos compañeros mejores.

Agradecer también a la gente del INIBIC su ayuda y su buena disposición siempre que lo necesité.

A los compañeros que ya no están en el laboratorio, pero siguen ahí. En especial a Susana por su constante apoyo, y por su asesoramiento, tanto informático como psicológico cuando hace falta, y a María Fraga, por esas tardes de desconexión arreglando el mundo.

A los amigos de fuera del laboratorio: A Noa, con la que seguí un camino paralelo desde que comencé en la facultad, por su constante apoyo y ayuda. Al Cucus (Santi, Vane, Nando, Nino, Suso, Fidel, Elisa y Alba) por esos fines de semana de fiestas, cenas y reuniones que ayudan a desconectar del día a día.

A Nathalie, por su constante apoyo, por su confianza en mí, y por su paciencia conmigo. Gracias por estar siempre a mi lado.

Y por supuesto, a mi familia, en especial a mis padres, a los cuales les debo todo lo que soy.



# Índice

---

Índice de abreviaturas	13
Índice de figuras	17
Índice de tablas	18
Resumen	19
1. INTRODUCCIÓN	25
1.1. Género <i>Acinetobacter</i> spp.	28
1.2. El patógeno <i>A. baumannii</i>	30
1.3. Trascendencia de la infección hospitalaria por <i>A. baumannii</i>	32
1.4. Resistencia a antibióticos en <i>A. baumannii</i>	33
1.4.1. Mecanismos de resistencia en <i>A. baumannii</i>	33
1.4.1.1. Resistencia a $\beta$ -lactámicos	33
1.4.1.2. Resistencia a aminoglucósidos	39
1.4.1.3. Resistencia a quinolonas	40
1.4.1.4. Resistencia a tetraciclinas y glicilglicinas	40

1.4.1.5. Resistencia a polimixinas	41
1.4.2. Mecanismos de intercambio genético: Transferencia de genes de resistencia en <i>A. baumannii</i>	41
1.5. Patogénesis en <i>A. baumannii</i>	44
1.6. Interacción huésped-patógeno: papel de las OMVs y respuesta del huésped	48
1.6.1. OMVs y virulencia	49
1.6.2. Respuesta del huésped ante la infección bacteriana: apoptosis y autofagia	50
1.6.2.1. Apoptosis	51
1.6.2.2. Autofagia	53
2. OBJETIVOS	55
3. CAPÍTULOS	59
3.1. Artículo I: Contribución de las bombas de expulsión, porinas y $\beta$ -lactamasas a la multirresistencia en aislados clínicos de <i>A. baumannii</i>	61
3.2. Artículo II: Transferencia horizontal del gen OXA-24 a través de vesículas de membrana externa: un nuevo mecanismo de diseminación de genes de resistencia a carbapenemas en <i>A. baumannii</i>	79



<b>3.3. Artículo III: La porina Omp33-36 de <i>A. baumannii</i> es un factor de virulencia que induce apoptosis y modula la autofagia en células humanas</b>	<b>91</b>
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>113</b>
4.1. Discusión artículo I	117
4.2. Discusión artículo II	121
4.3. Discusión artículo III	125
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>129</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>133</b>



# Índice de abreviaturas

---

**µg:** Microgramo

**2-DE:** Electroforesis bidimensional (*2-dimensional electrophoresis*)

**ABC:** *ATP binding cassette*

**ADC:** Cefalosporinasa derivada de *Acinetobacter* (*Acinetobacter-derived cephalosporinase*)

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**Ala:** Alanina

**AME:** Enzimas modificadoras de aminoglucósidos (*Aminoglycoside-modifying enzymes*)

**Apaf-1:** Factor activador de apoptosis 1 (*Apoptosis protease-activating factor-1*)

**ARDRA:** Análisis de restricción del ADN ribosomal (*Amplified rDNA Restriction Analysis*)

**ARN:** Ácido ribonucleico

**Atg:** Gen relacionado con autofagia (*Autophagy-related gene*)

**CHDL:** β-lactamasas de clase D hidrolizantes de carbapenemas (*Carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamases*)

**CLSI:** Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)

**CMI:** Concentración mínima inhibitoria

**ER:** Expresión relativa

**Fe<sup>3+</sup>:** Ion férrico

**Gly:** Glicina

**His:** Histidina

**IDSA:** Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (*Infectious Diseases Society of America*)

**IL-8:** Interleuquina-8

**Ile:** Isoleucina

**IS:** Secuencia de inserción (*Insertion Sequence*)

**KDa:** Kilodalton

**L:** Litro

**Leu:** Leucina

**LPS:** Lipopolisacárido

**Lys:** Lisina

**MALDI:** Desorción/ionización por láser asistida por matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*)

**MATE:** *Multidrug and toxic-compound extrusion*

**MBL:** Metallo- $\beta$ -lactamasas

**MEB:** Microscopía electrónica de barrido

**MEF:** Fibroblasto embrionario murino (*Mouse embryonic fibroblast*)

**MET:** Microscopía electrónica de transmisión

**MFS:** *Major facilitator superfamily*

**mg:** Miligramos

**MH:** Mueller Hinton

**mL:** Mililitro

**MLST:** Tipificación multilocus de secuencias (*Multilocus sequence typing*)

**mM:** Milimolar

**MRSA:** *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)

**NAC:** N-Acetilcisteína

**nm:** Nanómetro

**O-IMV:** Vesícula de membrana externa-interna (*Outer-inner membrane vesicle*)

**Omp:** Proteína de membrana externa (*Outer membrane protein*)

**OMV:** Vesícula de membrana externa (*Outer membrane vesicle*)

**PAbetaN:** Fenil-arginina- $\beta$ -naftilamida

**PBP:** Proteínas de unión a la penicilina (*Penicillin binding protein*)

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*)

**PFGE:** Electroforesis en campo pulsante (*Pulsed field gel electrophoresis*)

**PGC:** Peptidoglicano

**Phe:** Fenilalanina

**PI3-quinasa:** Fosfoinositol 3-quinasa

**Pro:** Prolina

**QRDR:** Regiones determinantes de resistencia a quinolonas (*Quinolone Resistance-Determining Regions*)

**REP-PCR:** PCR de secuencias palindrómicas extragénicas repetidas (*Repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR*)

**RND:** *Resistance nodulation division*

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno (*Reactive oxygen species*)

**RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (*Reverse transcription polymerase chain reaction*)

**Ser:** Serina

**SMR:** *Small multidrug resistance*

**TLR2:** Receptor de tipo Toll 2 (*Toll-like receptor 2*)

**TLR4:** Receptor de tipo Toll 4 (*Toll-like receptor 4*)

**TOF:** Tiempo de vuelo (*Time Of Flight*)

**UCI:** Unidad de cuidados intensivos

**UFC:** Unidad formadora de colonia

**Val:** Valina

**VRE:** *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (*Vancomycin-resistant Enterococcus*)

**zVAD-fmk:** Benciloxycarbonil-Valina-Alanina-Ácido Aspártico-fluorometil-cetona

# Índice de figuras

---

<b>Figura 1:</b> Imagen de un grupo de bacterias de <i>A. baumannii</i> obtenida mediante MEB.	31
<b>Figura 2:</b> Esquema de los diferentes mecanismos de intercambio genético existentes en bacterias gram negativas.	43
<b>Figura 3:</b> Esquema de los cambios morfológicos en las células eucariotas asociados a la apoptosis.	52
<b>Figura 4:</b> Diferentes fases del proceso autofágico.	53

# Índice de tablas:

---

<b>Tabla 1:</b> Listado de los microorganismos más peligrosos para el ser humano según la IDSA.	31
<b>Tabla 2:</b> Principales factores de virulencia presentes en <i>A. baumannii</i> .	48
<b>Tabla 3:</b> Interrelación entre los diferentes mecanismos de resistencia a diversos antibióticos en las cepas de los clones PFGE-ROC-1 y PFGE-HUI-1.	65



## RESUMEN

---



# Resumo

---

*Acinetobacter baumannii* xurdíu recentemente como un dos principais microorganismos multirresistentes causantes de infeccións nosocomiais. Esta multirresistencia é resultado da combinación da plasticidade do seu xenoma, da mutación de xenes endóxenos e da adquisición de material xenético externo. Neste traballo investigáronse os mecanismos de resistencia a diferentes antibióticos en cepas clínicas multirresistentes de *A. baumannii* pertencentes a dous clons non relacionados xeneticamente e con grande variabilidade de resistencia antibiótica, observándose que esta bacteria posúe mecanismos que traballan en conexión para o desenvolvemento da resistencia, así como para outras funcións necesarias para a patoxénese bacteriana.

A resistencia de *A. baumannii* a carbapenemas é un dos problemas máis preocupantes nos hospitais. A pesar diso, os seus sistemas de diseminación de xenes codificantes para  $\beta$ -lactamasas non se coñecen completamente. Neste traballo descríbese un novo método para a transferencia do xen *bla*<sub>OXA-24</sub> (codificante para unha carbapenemasa) mediante vesículas de membrana externa (OMVs).

Por outra parte, a pesar da importancia e a gravidade das infeccións causadas por *A. baumannii*, existen poucos mecanismos de virulencia descritos para esta bacteria. Este traballo mostra a capacidade dunha das súas porinas, a Omp33-36 (tamén denominada Omp33 ou Omp34 nalgúns *Acinetobacter* spp.), de causar apoptose e autofaxia en células eucariotas, e a súa implicación en virulencia.

# Resumen

---

*Acinetobacter baumannii* ha emergido recientemente como uno de los principales microorganismos multirresistentes causantes de infecciones nosocomiales. Esta multirresistencia es resultado de la combinación de la plasticidad de su genoma, de la mutación de genes endógenos y de la adquisición de material genético externo. En este trabajo se investigaron los mecanismos de resistencia a diferentes antibióticos en cepas clínicas multirresistentes de *A. baumannii* pertenecientes a dos clones no relacionados genéticamente y con gran variabilidad de resistencia antibiótica, observándose que esta bacteria posee mecanismos que trabajan en conexión para el desarrollo de la resistencia, así como para otras funciones necesarias para la patogénesis bacteriana.

La resistencia de *A. baumannii* a carbapenemas es uno de los problemas más preocupantes en los hospitales. A pesar de esto, sus sistemas de diseminación de genes codificantes para  $\beta$ -lactamasas no se conocen completamente. En este trabajo se describe un nuevo método para la transferencia de genes de resistencia a carbapenemas (*bla*<sub>OXA-24</sub>) mediante vesículas de membrana externa (OMVs).

Por otra parte, a pesar de la importancia y gravedad de las infecciones causadas por *A. baumannii*, existen pocos mecanismos de virulencia descritos para esta bacteria. Este trabajo muestra la capacidad de una de sus porinas, la Omp33-36 (también denominada Omp33 u Omp34 en algunos *Acinetobacter* spp.), de causar apoptosis y modular la autofagia en células eucariotas, y su implicación en virulencia.

# Abstract

---

*Acinetobacter baumannii* has emerged recently as one of the most important multiresistant bacteria that causes nosocomial infections. This multiresistance is a result of the combination of its genomic plasticity, the mutation of endogenous genes, and the acquisition of foreign genetic material. In this work, the mechanisms of resistance to different antibiotics were investigated in multiresistant clinical strains of two unrelated *A. baumannii* clones displaying varying levels of antibiotic resistance. We observed that these strains have mechanisms connected that enable them to develop resistance to antimicrobials and that also have other functions necessary in bacterial pathogenesis.

The resistance of *A. baumannii* to carbapenems is a worrying problem in hospital settings, but the mechanisms of dissemination of the genes that codified to  $\beta$ -lactamases are not fully understood. We describe here a new mechanism of gene transfer whereby carbapenem resistance genes (*bla*<sub>OXA-24</sub> gene) are delivered by outer membrane vesicles (OMVs).

Despite the importance and severity of infections caused by *A. baumannii*, there are few virulence mechanisms described to this bacterium. This work shows the capacity of one of its porins, Omp33-36 (so called Omp33 or Omp34 in some *Acinetobacter* spp.), to cause apoptosis and autophagy in eukaryotic cells, and its implication in virulence.



# 1. INTRODUCCIÓN

---





### 1. INTRODUCCIÓN

Una de las principales causas de mortalidad a lo largo de la historia ha sido la provocada por las enfermedades infecciosas, por lo que el descubrimiento y posterior desarrollo de los antibióticos es considerado el logro más importante de la Medicina en el siglo XX. Su uso y expansión permitió disminuir drásticamente la mortalidad y la morbilidad causada por infecciones bacterianas. Prácticamente simultánea a este desarrollo, ha sido la adaptación de las bacterias mediante la aparición de resistencias a los antibióticos, llegando a aparecer especies multirresistentes, convirtiéndose éstas en uno de los mayores retos a los que se enfrenta la medicina actual por la seria amenaza a la salud humana que ello representa.

Dentro de los géneros que han destacado por su multirresistencia a antibióticos, sobresale *Acinetobacter* spp., en especial la especie *Acinetobacter baumannii*. Este organismo, el cual es frecuentemente encontrado colonizando la microbiota del suelo, la piel, o el tracto respiratorio, ha sido considerado durante muchos años una bacteria inocua. Sin embargo, en los últimos 30 años, ha emergido como uno de los principales organismos multirresistentes y uno de los principales causantes de infecciones nosocomiales. Es por esto que un mejor conocimiento de esta bacteria es necesario, ya no solo de los mecanismos que la hacen resistente, sino también de cómo es capaz de adquirir y dispersar los genes de resistencia. Además, la importancia y gravedad de las infecciones causadas por *A. baumannii* hacen necesario el estudio de las características que contribuyen al desarrollo de la infección y las interacciones que se producen entre esta bacteria y las células del huésped.

En el presente trabajo mecanismos de resistencia, de dispersión de genes de resistencia y patogénesis han sido objeto de estudio. Concretamente, en el capítulo 1 se aborda el papel de las bombas de expulsión, porinas y  $\beta$ -lactamasas cromosómicas en el fenotipo multirresistente de cepas clínicas de *A. baumannii* y la interrelación entre los diferentes mecanismos que implican estas

resistencias. En el capítulo 2, se describe un nuevo método de dispersión de genes de resistencia a carbapenemas a través de vesículas de membrana externa (OMVs por sus siglas en inglés). Finalmente, en el capítulo 3, se describe como una proteína de membrana externa de *A. baumannii*, relacionada con la resistencia a carbapenemas, la Omp33-36, puede actuar como un factor de virulencia causando apoptosis y modulando la autofagia en células eucariotas.

### **1.1. Género *Acinetobacter* spp.**

El género *Acinetobacter* está formado por bacterias que tienen en común ser coccobacilos gram negativos, estrictamente aerobios, no fermentativos, catalasa positivos, oxidasa negativos y con un contenido de guanina y citosina en su ADN de entre el 39% y el 47% (1). La primera cepa de *Acinetobacter* fue aislada del suelo, e identificada como *Micrococcus calcoaceticus* por Beijerinck en 1911 (2), y hasta la creación del género en 1957 por Brisou y Prevot, éste estuvo insuficientemente definido, sufriendo un gran número de cambios taxonómicos, y llegando a ser denominada con hasta 15 géneros diferentes (3). A día de hoy, basándose en estudios de hibridación ADN-ADN y siguiendo los criterios de la taxonomía actual, el género *Acinetobacter* incluye más de 40 genoespecies, de las cuales 34 son especies validadas ([www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html](http://www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html)). Desde el punto de vista clínico, las especies más relevantes son *A. baumannii*, y las especies genómicas 3 y 3TU (4) recientemente denominadas como *Acinetobacter pittii* sp. nov. y *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov., respectivamente. (5). Estas 3 especies, junto *A. calcoaceticus*, están tan estrechamente relacionadas que es complicado distinguirlas por los métodos fenotípicos rutinarios, por lo que han sido incluidas dentro de un grupo común denominado complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*, aunque desde un punto de vista clínico, esto no es apropiado, ya que incluye 3 de las especies clínicas más relevantes (*A. baumannii*, *A. pittii* y *A. nosocomialis*) con una especie ambiental (*A. calcoaceticus*) (4).

Basándose en la ecología, epidemiología, y fenotipo antibiótico de los diferentes aislados, el género *Acinetobacter* fue dividido en tres grandes poblaciones (6):

- Cepas aisladas de ambiente y equipamiento hospitalario, personal médico y pacientes hospitalizados. Formado principalmente por *A. baumannii* y cepas estrechamente relacionadas. Suelen ser resistentes a múltiples antibióticos, aunque a este grupo pertenecen excepciones como los aislados clínicos *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup> y *A. baumannii* ATCC 17978, que son sensibles a la mayoría de los antibióticos.
- Cepas pertenecientes a la microbiota de la piel humana y animal, que también pueden ser encontrados en alimentos en mal estado. En este grupo estarían incluidas especies como *Acinetobacter lwoffii* y *Acinetobacter radioresistens*.
- Cepas sensibles a antibióticos obtenidas de fuentes ambientales como el suelo y aguas residuales. Este grupo abarcaría a *Acinetobacter calcoaceticus* y *A. johnsonii*.

La mayoría de los componentes de las dos últimas poblaciones son sensibles a antibióticos, aunque existen excepciones como *A. johnsonii*, y *A. calcoaceticus*, en los cuales se ha observado la existencia de genes de resistencia a carbapenemas (7).

Los componentes de este género pueden ser encontrados en un amplio rango de nichos ecológicos, desde la piel humana (8) hasta el suelo y el agua (9). La habilidad de estas bacterias para colonizar casi cualquier superficie, y la capacidad de adquirir resistencia antibiótica las distingue de otras bacterias infecciosas. En los últimos años, las bacterias pertenecientes al género *Acinetobacter* han visto incrementada su importancia y se han convertido en uno de los principales focos de atención debido a varias razones. Por un lado, la capacidad de causar graves infecciones nosocomiales (10) y su capacidad de

adquirir y desarrollar resistencia a antibióticos (1, 11) han hecho de este género uno de los más importantes desde el punto de vista clínico. Por otra parte, su capacidad para eliminar el fósforo de aguas residuales (12), o su recientemente demostrada capacidad para degradar hidrocarburos (13), hacen que sea un género interesante por sus posibles aplicaciones en biorremediación.

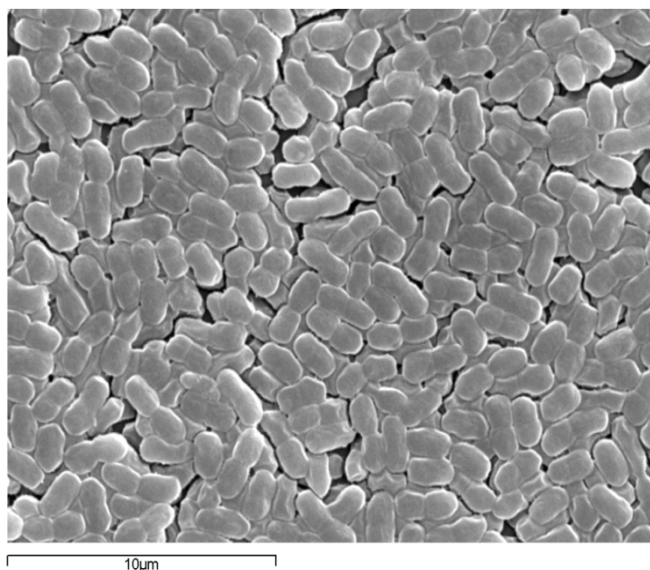
Como se ha comentado anteriormente, desde el punto de vista clínico, una de las especies que más ha destacado por su importancia en este género es *A. baumannii*. Esta bacteria se ha manifestado como un patógeno sumamente importante debido al incremento de las infecciones nosocomiales que ha causado en los últimos 30 años, y la propagación global de cepas portadoras de resistencias a múltiples antibióticos.

### 1.2. El patógeno *A. baumannii*

*A. baumannii* (Figura 1) es un bacilo gram negativo oportunista, no fermentativo, no flagelado, que forma parte de la microbiota normal de la piel humana, así como del tracto gastrointestinal y del aparato respiratorio superior. Además, también es común en el suelo y en el agua (9, 14).

Recientemente, este microorganismo se ha manifestado como un importante patógeno. Los brotes nosocomiales de *A. baumannii* multirresistente a antibióticos se han visto incrementados en hospitales de todo el mundo, teniendo especial relevancia en las unidades de quemados (14, 15) y en UCIs (16). Esta bacteria ha sido incluida en la lista de los seis microorganismos más peligrosos según la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA por sus siglas en inglés) (17) (Tabla 1) debido principalmente a dos razones:

- Su habilidad para crecer a diferentes valores de temperatura y pH, lo que hace que *A. baumannii* tenga la capacidad de sobrevivir en numerosos materiales utilizados en los hospitales (catéteres, ventilación mecánica) y pueda sobrevivir durante un considerable periodo de tiempo en ambientes hospitalarios (3, 18).



**Figura 1:** Imagen de un grupo de bacterias de *A. baumannii* obtenida mediante MEB.

- La multirresistencia de estos microorganismos adquirida debido a la alta plasticidad de su genoma mediante intercambio genético, y la baja permeabilidad de su membrana externa a determinados antibióticos (19-21).

El tipo de infecciones producidas por esta bacteria incluye neumonía, septicemia, infecciones en el tracto urinario y meningitis (3). En muchos casos, estas infecciones son adquiridas

tras la exposición a *A. baumannii* a través del material hospitalario contaminado o por contacto con el personal que ha estado expuesto al microorganismo a través de un paciente colonizado (22). Estas infecciones, además de estar asociadas a una alta mortalidad, llevan a un incremento de la estancia en el hospital de los pacientes, lo que se traduce en un incremento de los gastos médicos (23, 24).

**Tabla 1:** Listado de los microorganismos más peligrosos para el ser humano según la IDSA (17).

---

<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA)
<i>Escherichia coli</i> y especies de <i>Klebsiella</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Aspergillus</i>
<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina (VRE)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

---

### 1.3. Trascendencia de la infección hospitalaria por *A. baumannii*

*A. baumannii* es responsable de un cada vez mayor número de infecciones hospitalarias. En muchas ocasiones, estas infecciones son causadas por cepas multirresistente, afectando generalmente a individuos con otras graves enfermedades subyacentes (4), lo cual empeora la situación considerablemente.

La manifestación clínica más común de la infección por *A. baumannii* es la neumonía (25, 26), siendo también muy habituales las infecciones sanguíneas (26) y las infecciones por quemaduras (15, 27). Con menor frecuencia, aparece implicado en casos de meningitis (28-30), infecciones de tejidos blandos y piel (30, 31) y osteomielitis (32), ocurriendo estas dos últimas principalmente en personal militar. También se han descrito casos excepcionales de endocarditis (33).

La neumonía causada por *A. baumannii* suele ocurrir en pacientes con ventilación mecánica en UCIs. La enfermedad se desarrollaría a través de la colonización de las vías aéreas mediante la exposición ambiental al patógeno (4). La mortalidad cruda asociada a esta infección está entre el 40% y el 70% (23, 34).

Las infecciones sanguíneas causadas por este patógeno son comunes en las UCIs. Los orígenes más comunes de infección son las vías respiratorias inferiores, y los dispositivos intravasculares (35-37), siendo también las infecciones en heridas y del tracto urinario importantes fuentes de infección (38). La mortalidad cruda de estas infecciones está entre el 28% y el 43% (38).

*A. baumannii* es una causa importante de infecciones por quemaduras, aunque, al igual que ocurre en los casos de neumonía, es difícil establecer la diferencia entre infección y colonización. El alto porcentaje de este tipo de infecciones causadas por cepas multirresistentes, y la mala penetración de muchos antibióticos en las quemaduras hace que éstas sean extremadamente difíciles de tratar (25). Estas infecciones son especialmente trascendentes en

personal militar, donde es la más común de las infecciones por quemaduras (39). A pesar de su seriedad, no hay datos clínicos claros sobre la mortalidad que genera.

La infección en tejidos blandos y piel por parte de esta bacteria en UCIs es atípica (40, 41), aunque su implicación en las mismas no está clara debido a la dificultad para diferenciar colonización e infección. Sin embargo, en personal militar, se ha manifestado como un grave problema (41, 42), cuyo tratamiento se ha visto dificultado por las multirresistencias. Una situación parecida ocurre con los casos de osteomielitis, cuyos casos han alcanzado una importancia significativa en personal militar proveniente de Iraq y Afganistán (32).

Se ha descrito un incremento en casos de meningitis causadas por *A. baumannii*, siendo la mayoría de pacientes que se recuperan de neurocirugías (29, 43). Debido a los pocos casos existentes, es difícil estimar el rango de mortalidad.

### **1.4. Resistencia a antibióticos en *A. baumannii***

#### **1.4.1. Mecanismos de resistencia en *A. baumannii***

La capacidad de *A. baumannii* para adquirir diferentes mecanismos de resistencia a antibióticos le ha permitido persistir en los ambientes hospitalarios y ha facilitado la emergencia de las cepas multirresistentes a nivel global.

A continuación, se describirán los principales mecanismos de resistencia en *A. baumannii*.

##### **1.4.1.1. Resistencia a $\beta$ -lactámicos**

En *A. baumannii* se distinguen cuatro mecanismos mediante los cuales las bacterias son resistentes a  $\beta$ -lactámicos:

- Hidrólisis mediante  $\beta$ -lactamasas.
- Cambios en las proteínas de unión a la penicilina (PBPs) que impiden su acción.
- Disminución de la permeabilidad a los antibióticos a través de la membrana externa bacteriana modificando el número de porinas.
- La actividad de bombas de expulsión que disminuyen la concentración del antibiótico en el interior de la bacteria.

### I. Hidrólisis mediante $\beta$ -lactamasas

El mecanismo más predominante en *A. baumannii* en cuanto a resistencia a  $\beta$ -lactámicos se refiere es la degradación enzimática por  $\beta$ -lactamasas. Basándose en su estructura molecular, las  $\beta$ -lactamasas fueron clasificadas por Ambler en 1980 en cuatro clases: A, B, C, D (44).

#### a) $\beta$ -lactamasas de clase A

Las  $\beta$ -lactamasas de clase A son enzimas serina dependientes, al igual que las de clase C y D. Presentan, por tanto, una serina en el sitio activo, necesaria para catalizar la hidrólisis del antibiótico.

Se han descrito diversos tipos de  $\beta$ -lactamasas de clase A en *Acinetobacter*. Así, se han publicado casos de aislamientos portadores de TEM (45), y CARB-5 (45, 46), enzimas que hidrolizan la ampicilina, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas.

Por otra parte, también se han descrito  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. Estas enzimas son de configuración plasmídica, e hidrolizan antibióticos como cefalosporinas de tercera y cuarta generación y el aztreonam. Destacan en este grupo PER-1 y PER-2 (47, 48), Veb-1 (49), SHV (50) y CTX-M-2 (51). La detección de estas  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido es compleja debido a la presencia de cefalosporinasas cromosómicas intrínsecas, con lo que,



a pesar de su importante capacidad hidrolítica, no se sabe con certeza lo extendidas que están estas enzimas en *A. baumannii*.

### b) $\beta$ -lactamasas de clase B

Las  $\beta$ -lactamasas de clase B, también denominadas como metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL) son enzimas capaces de hidrolizar carbapenemas, así como otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos, excepto el aztreonam. Al contrario que las  $\beta$ -lactamasas A y C, no son enzimas serina dependientes, sino que poseen un ion metálico en el sitio activo, generalmente Zinc, necesario para la catálisis (52).

Este tipo de  $\beta$ -lactamasas se encuentran frecuentemente localizadas en integrones de clase 1, formando parte de transposones, lo que les permite desplazarse con relativa facilidad de unas bacterias a otras (53).

En *Acinetobacter*, se han descrito 3 clases de enzimas de este tipo: IMP (54, 55), VIM (56, 57) y SIM (58).

### c) $\beta$ -lactamasas de clase C

Las  $\beta$ -lactamasas de clase C, en general, son enzimas cefalosporinasas que presentan un perfil hidrolítico mayor sobre cefalosporinas que sobre penicilinas, no inhibibles, además, por ácido clavulánico.

*Acinetobacter* spp., al igual que otras bacterias gram negativas, presenta una  $\beta$ -lactamasas clase C en su cromosoma, concretamente, el gen *ampC*, que expresa de manera constitutiva una cefalosporinasa. El mecanismo más frecuente asociado a resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación es la expresión de esta cefalosporinasa, cuya sobreexpresión está relacionada con la secuencia de inserción *ISAba1* (59), situada aguas arriba del gen.

A partir de análisis filogenéticos, se ha encontrado que los genes cromosómicos *ampC* en *Acinetobacter* spp. podrían descender de un gen

ancestro común codificante para una  $\beta$ -lactamasa, de forma que estarían más relacionados entre sí que con otros genes *ampC* presentes en otras bacterias (60). Así, se ha propuesto que estos genes representarían una nueva familia de  $\beta$ -lactamasas denominadas cefalosporinasas derivadas de *Acinetobacter* (ADCs) (61).

d)  $\beta$ -lactamasas de clase D

Las  $\beta$ -lactamasas de clase D, también denominadas OXAs, suelen ser potentes penicilinasas (oxacilinasas), y algunas son capaces de hidrolizar cefalosporinas de amplio espectro. Las más preocupantes son las OXAs que inactivan carbapenemas, también denominadas  $\beta$ -lactamasas de clase D hidrolizantes de carbapenemas (CHDLs), siendo éstas las carbapenemasas más comúnmente identificadas en *A. baumannii*.

Se distinguen 4 subgrupos de este tipo de  $\beta$ -lactamasas (62). El primero de ellos, el CHDL OXA-23, con su derivada OXA-27, constituye el mayor subgrupo de CHDLs en cuanto a distribución geográfica se refiere. La primera OXA con actividad carbapenemasa descrita fue la OXA-23, que fue obtenida de un aislado clínico en Escocia en 1985 (63, 64), y a partir de ahí, se ha ido descubriendo distribuida a lo largo de todo el mundo. Se trata de carbapenemasas plasmídicas (65). El segundo subgrupo de CHDLs estaría formado por OXA-24 (también llamada OXA-40), OXA-25, OXA-26 y OXA-72. Los productores de OXA-24/40 son particularmente predominantes en Estados Unidos, España y Portugal (62). Comprende carbapenemasas principalmente cromosómicas identificadas en diversas cepas epidémicas (65) encontrándose también algunas plasmídicas (66). En el caso de la familia OXA-58, con sus variantes OXA-96, OXA-97 y OXA-164 están distribuidas por todo el mundo (62). Estas carbapenemasas pueden ser cromosómicas y plasmídicas (65). La expresión de estas enzimas se ve aumentada cuando el gen va acompañado de las secuencias de inserción *ISAba1* e *ISAba3* (67). La familia OXA-51 comprende carbapenemasas cromosómicas, y ha sido descrita como intrínseca

a *A. baumannii* (68). Su expresión puede ser aumentada por la inserción aguas arriba de la secuencia IS*Aba1*, la cual actúa como un eficaz promotor (69).

Dentro de las OXAs no carbapenemasas merece la pena destacar las oxacilinasas OXA-21 y OXA-37, asociadas ambas a integrones (70, 71).

## II. Modificación en las proteínas de unión a la penicilina (PBPs)

Las PBPs son proteínas esenciales para la biosíntesis de la pared bacteriana durante la proliferación celular, y éstas son diana de las  $\beta$ -lactamasas, las cuales provocan inhibición del crecimiento y de la división celular, y pérdida de la biosíntesis de la pared, lo cual lleva a la lisis de la bacteria.

La resistencia a  $\beta$ -lactámicos se desarrolla mediante la alteración de las PBPs y sus propiedades, de forma que las bacterias pueden disminuir la afinidad por el antibiótico mediante la variación del número de PBPs (reduciendo su número o sobreexpresando una determinada PBP), o produciendo una nueva PBP modificada.

En *A. baumannii*, Gehrlein *et al.* (72) estudiaron la resistencia a carbapenemas en mutantes resistentes y su relación con PBPs, encontrando una disminución de seis PBPs y la sobreexpresión de una PBP de 24 KDa. Por otra parte, Cuenca *et al.* (73) describieron como una PBP de 73,2 KDa (PBP2a) se relaciona con la resistencia a imipenem y meropenem, mientras que su total ausencia, junto con otra de 70,1 KDa (PBP2b), se asocia con niveles de resistencia más elevados en ambos compuestos.

## III. Modificaciones en el número de porinas

Las porinas son proteínas transmembranales o de membrana externa cuya función es permitir el paso de productos al interior de las bacterias. Poco se sabe sobre las porinas de *A. baumannii*. Su bajo número y pequeño tamaño

explican su baja permeabilidad en comparación con otros patógenos gram negativos, y son causa intrínseca de la resistencia a antibióticos que presenta. Así, estudios llevados a cabo por Sato y Nakae (74) revelaron que el coeficiente de permeabilidad para cefalosporinas es de 2 a 7 veces mayor en *P. aeruginosa* que en *Acinetobacter* spp.

Diversos estudios han demostrado que estas proteínas tienen un importante papel en la resistencia a carbapenemas. Así, la reducción de CarO, una porina de 29 KDa que forma un canal inespecífico, está relacionada con resistencia a imipenem y meropenem (75, 76). Por otra parte, la pérdida de la porina Omp33-36 está asociada a la resistencia a carbapenemas (77). Otra porina relevante con respecto a la resistencia a  $\beta$ -lactámicos sería la HMP-AB (también denominada OmpA), proteína modificable por calor (78) y homóloga de OmpA de *Enterobacteriaceae* y OmpF de *P. aeruginosa* (79). Esta porina está implicada en la resistencia a aztreonam (80). Aunque su mecanismo de acción no está del todo claro, participaría en la expulsión de componentes del periplasma a través de la membrana externa acoplándose con sistemas de expulsión de la membrana interna, como sistemas de expulsión RND carentes del componente de la membrana externa (80).

#### IV. Bombas de expulsión

Las bombas de expulsión son mecanismos que median el flujo de salida de compuestos tóxicos para la bacteria, como los antibióticos, en un intercambio acoplado con protones. En *A. baumannii* se han identificado sistemas de expulsión asociados a resistencia a antibióticos pertenecientes a cinco superfamilias: ABC, RND, MATE, MFS y SMR (81), destacando entre las más importantes las RND asociadas a resistencia a  $\beta$ -lactámicos.

AdeABC, perteneciente a la superfamilia RND, es la bomba mejor caracterizada en *A. baumannii*. Como todas las bombas de este tipo, presenta una estructura formada por tres componentes: AdeB, que forma el componente transmembrana; AdeA, que forma la proteína de fusión de la membrana interna;

y AdeC, que es la proteína de membrana externa. La bomba AdeABC es codificada en el cromosoma, y está regulada por un sistema de dos componentes: un sensor quinasa (AdeS) y un regulador de respuesta (AdeR) (82). Sus sustratos son, entre otros antibióticos, los  $\beta$ -lactámicos, incluyendo carbapenemas (83, 84). La sobreexpresión de esta bomba, provocada por mutaciones en su sistema regulador, confiere alta resistencia a carbapenemas.

AdelJK fue el segundo sistema RND descrito en *A. baumannii* y, entre otros antibióticos, también es capaz de expulsar  $\beta$ -lactámicos, contribuyendo a su resistencia intrínseca (85).

### 1.4.1.2. Resistencia a aminoglucósidos

La resistencia a aminoglucósidos en *A. baumannii* es mediada principalmente por enzimas modificantes de aminoglucósidos (AMEs), en las que se incluyen aminoglucósido-fosfotransferasas, aminoglucósido-acetiltransferasas y aminoglucósido-nucleotidiltransferasas (60). Estas enzimas actúan impidiendo la unión del aminoglucósido a su diana, de forma que se confiere un alto nivel de resistencia para todos los aminoglucósidos usados clínicamente, incluyendo la gentamicina, la tobramicina, y la amikacina (86).

Además de estas enzimas, también estarían implicadas en la resistencia a aminoglucósidos la bomba AdeABC, de la cual son sustratos, presentando una menor efectividad para la eliminación de kanamicina y amikacina debido a su naturaleza hidrofílica (87). También se ha descrito que la bomba AbeM, perteneciente a la superfamilia MATE, tiene como sustratos la gentamicina y la kanamicina (88).

Recientemente, se ha descrito un nuevo mecanismo de resistencia a aminoglucósidos, en el cual está implicada la acción de una metilasa del ARNr 16S: ArmA. ArmA metila el sitio activo del ribosoma, lo cual da lugar a resistencia a todos los aminoglucósidos (62).

#### 1.4.1.3. Resistencia a quinolonas

Los mecanismos de resistencia de *A. baumannii* a quinolonas afectan a los genes que codifican para la girasa A (p. ej., *gyrA*) y para la subunidad A de la topoisomerasa IV (p. ej., *parC*) (89). Concretamente, estas mutaciones afectan a las regiones determinantes de resistencia a quinolonas (regiones QRDR) de los genes *gyrA* y *parC*, siendo las mutaciones más importantes las que provocan cambios en el codon 83 para *gyrA* y en el codon 80 para *parC* (90, 91). Estos cambios tienen como resultado una menor afinidad por la unión de la quinolona al complejo ADN-Enzima. Además de por estas mutaciones, la resistencia a quinolonas también puede ser mediada por las bombas de expulsión AdeABC y AbeM (1); y por OmpA, implicada en resistencia a ácido nalidíxico (80).

#### 1.4.1.4. Resistencia a tetraciclinas y glicilglicinas

La resistencia a tetraciclinas y sus derivados puede ser mediada por dos mecanismos en *A. baumannii*: a través de bombas de expulsión y mediante protección ribosomal.

TetA y TetB, bombas de expulsión pertenecientes a la superfamilia MFS, son las más prevalentes en *A. baumannii*, en las que TetA confiere resistencia a tetraciclina, y TetB a tetraciclina y minociclina (92). Tet39 también ha sido descrito en *A. baumannii* como mecanismo de resistencia a tetraciclinas mediante un sistema activo de expulsión (93), y aunque es más frecuente en ambientes acuáticos que en aislados clínicos, es un relevante mecanismo de resistencia en cepas clínicas (94). Al igual que TetA, tampoco confiere resistencia a minociclina.

La protección ribosomal es mediada por *tetM*, que codifica para una proteína que protege el ribosoma de la acción de la tetraciclina, doxiciclina y minociclina (95).

Las glicilglicinas son una nueva clase de antibióticos de tetraciclinas modificadas, de los cuales la tigeciclina es el principal componente. La resistencia a estos antibióticos está mediada por el transportador AdeABC (96). Además, la bomba AdeIJK también parece actuar de una forma sinérgica con AdeABC para la eliminación de tigeciclina (85).

#### **1.4.1.5. Resistencia a polimixinas**

A pesar de que recientemente se han descrito brotes de *A. baumannii* resistentes a polimixinas (97-99) poco se conoce sobre su mecanismo de resistencia. En gram negativos, esta resistencia viene dada por modificaciones en el lipopolisacárido que interfieren en la unión del antibiótico a la membrana externa bacteriana (100). En *A. baumannii* se han descrito dos mecanismos de resistencia a colistina. El primero de ellos implica la inactivación total de la ruta de síntesis del lípido A, lo que lleva a la pérdida total del lipopolisacárido (LPS). Diferentes mutaciones, como deleciones, mutaciones puntuales o inserciones, pueden inactivar uno de los tres primeros genes (*lpxA*, *lpxC*, y *lpxD*) de la ruta biosintética del lípido A (101-103). El segundo mecanismo implica cambios que afectan a la regulación de la expresión en el sistema regulador de dos componentes PmrA/B, los cuales afectan a la expresión de genes implicados en la modificación del Lípido A (*pmrA*, *pmrB*), alterándose así su susceptibilidad a la colistina (104, 105).

#### **1.4.2. Mecanismos de intercambio genético: Transferencia de genes de resistencia en *Acinetobacter***

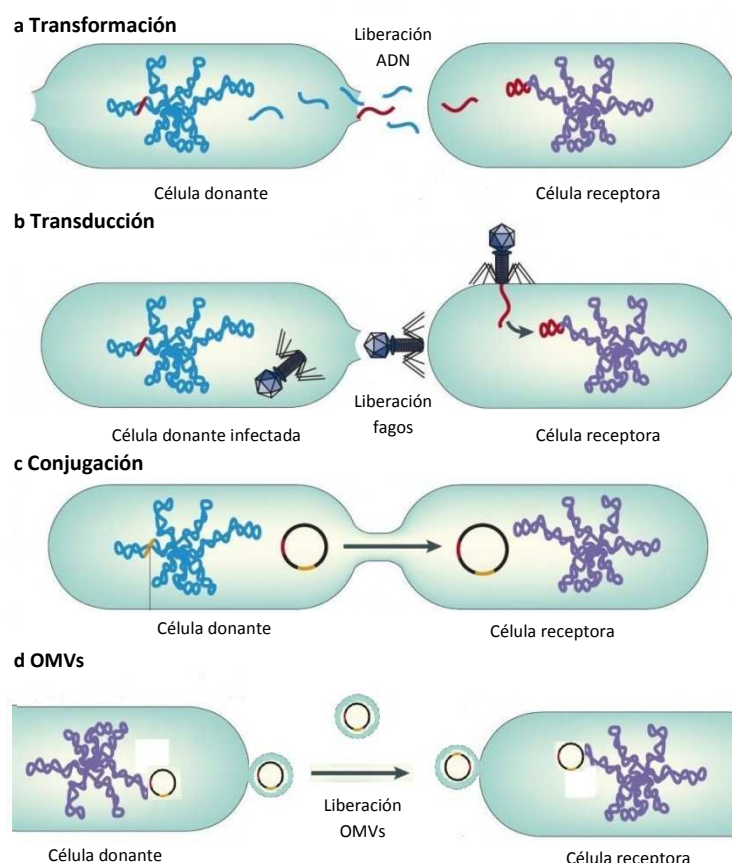
En las bacterias gram negativas, el ADN puede ser intercambiado por conjugación, transducción y transformación (106, 107) y, recientemente, se ha descrito un nuevo mecanismo de intercambio genético a través de OMVs (Figura 2). La transformación es la adquisición directa de ADN libre. Las bacterias que captan el ADN se denominan transformantes y, para que esto tenga lugar, es necesario que la bacteria sea competente, es decir, que permita que el ADN se una a su superficie y penetre en el interior, favoreciendo así la adquisición de

nuevos genes. Este ADN, una vez internalizado, podrá mantenerse como elemento autónomo, en caso de que lo sea, o bien integrarse en el genoma del huésped. En la transducción, es un virus bacteriófago el que transfiere los genes entre bacterias compatibles, siendo un proceso más restringido y específico que los demás. Desde el punto de vista clínico, es más importante en gram positivos. Para que se lleve a cabo la conjugación, es necesario que las bacterias estén en contacto entre sí, participando en el proceso el denominado “pilus conjugativo”, a través del cual se produce el intercambio del material genético. Las OMVs son estructuras esféricas que son secretadas de forma natural por todas las bacterias gram negativas (108). Su maquinaria de secreción sigue siendo desconocida. Aunque en un principio se creía que su formación era debida a un proceso físico asociado al desgaste de la membrana externa, actualmente se cree que se trata de un elaborado mecanismo, existiendo numerosas teorías sobre su proceso de biogénesis (109). Miden entre 20 y 200 nm, y están formadas a partir de la membrana externa bacteriana, por lo que están compuestas principalmente por proteínas de membrana externa, proteínas periplásmicas y lipopolisacáridos, aunque también se han descrito casos de OMVs formadas, además, por membrana interna y conteniendo material citoplasmático en su interior (109). Se ha observado que este tipo de OMVs se pueden formar tanto por estrés (110) como de manera natural (111). Pérez Cruz *et al.* observaron recientemente que *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup> produce 2 tipos de OMVs de forma natural, proponiendo un nuevo nombre para las OMVs formadas, además, por membrana interna: vesículas de membrana externa-interna (O-IMV) (111). En el interior de las OMVs se pueden encontrar también ácidos nucleicos, tanto ADN como ARN (109), los cuales pueden ser transmitidos a otras bacterias, por lo que, entre las muchas funciones que presentan las OMVs, también estaría el intercambio genético (Figura 2). Se facilita así la transmisión de genes a largas distancias y, al estar en el interior de las OMVs, se proporciona un ambiente adecuado para la protección del ADN de la acción de nucleasas. Se han descrito casos de transferencia de genes mediante este mecanismo en bacterias como *E. coli* (112) o *Ruminococcus* spp. (113).



En el género *Acinetobacter*, se ha descrito transferencia horizontal genética a través de conjugación, transformación y transducción (114-116), y recientemente, en *A. baylyi* se ha descrito transferencia genética a través de OMVs (117). Este mecanismo actuaría tanto intraespecie como interespecie, existiendo diferentes mecanismos de liberación de ADN dependiendo del receptor (117). Por otra parte, se ha demostrado que *A. baumannii* ATCC 19606

produce varios tipos de OMVs *in vitro* según la fase de crecimiento en la que se encuentre, las cuales pueden variar en composición y tamaño (118). Algunas de estas OMVs estarían formadas por membrana interna y externa, conteniendo en su interior constituyentes del periplasma y del citosol (118), permitiendo de esta forma la llegada de ADN a las vesículas.



**Figura 2:** Esquema de los diferentes mecanismos de intercambio genético existentes en bacterias gram negativas. Imagen modificada a partir de la referencia (107).

asociados con elementos genéticos como transposones, integrones o plásmidos, lo cual es indicativo de su adquisición mediante transferencia horizontal (4, 119). Los plásmidos son elementos que presentan capacidad de replicarse autónomamente. Se han asociado a plásmidos genes de resistencia a aminoglucósidos (120) y a  $\beta$ -lactámicos (4). Los transposones son elementos genéticos móviles que están integrados en el cromosoma o en plásmidos. Son

Muchos de los genes que codifican para enzimas inactivadoras de antibióticos pueden estar

muy importantes en la diseminación de genes de resistencia en *Acinetobacter* (60). Muchos de estos transposones contienen integrones. Éstos son elementos genéticos incapaces de moverse por sí mismos, por lo que necesitan un plásmido o un transposón para moverse (60). Son capaces de capturar y movilizar genes de resistencia antibiótica, siendo los más frecuentemente asociados a este tipo de genes los de clase 1 y los de clase 2 (119). En *Acinetobacter* son predominantemente de clase 1, mientras que la distribución de los de clase 2 es más variable, siendo más abundantes en cepas clínicas de Sudamérica (121). El primer integrón de clase 2 con un gen codificante para  $\beta$ -lactamasas ha sido identificado recientemente en *A. baumannii*, y está compuesto por siete determinantes de resistencia, incluyendo *bla*<sub>CARB-4</sub>. (122). El nivel de expresión en algunos genes de resistencia presentes en *A. baumannii* es muy bajo, pudiendo ser sobreexpresados debido a la acción de elementos genéticos. Es el caso de las  $\beta$ -lactamasas y las secuencias de inserción (IS), que proporcionan un eficiente promotor que produce su sobreexpresión (4). Los IS son los elementos genéticos más pequeños capaces de transponerse independientemente en un organismo, pudiendo causar mutaciones por inserción y reordenamientos genómicos. Las IS codifican para transposasa, lo que las hace un elemento genético móvil; proporcionan promotores para activar o aumentar la expresión de genes de resistencia aguas abajo; y movilizan genes asociados a ISs a través de integrones, transposones, plásmidos y cromosoma, incrementando así la probabilidad de que un gen de resistencia pueda ser transferido. En *Acinetobacter* se han identificado más de 30 ISs, estando asociadas la mayoría a genes codificantes para  $\beta$ -lactamasas (119).

### **1.5. Patogénesis en *A. baumannii***

La patogénesis microbiana es definida por factores que favorecen la colonización, el desarrollo de la infección y la persistencia en superficies, tanto vivas como inertes, de la bacteria. A pesar de que *A. baumannii* es una de las especies más estudiadas, y su importancia como patógeno es elevada, los mecanismos que intervienen en su patogénesis no están muy claros, y ha sido

en los últimos años cuando han empezado a aparecer diversos trabajos tratando este tema.

En *A. baumannii* se han descrito los siguientes mecanismos patogénicos (Tabla 2):

- Adherencia y formación de biofilm: *A. baumannii* posee la capacidad de interactuar con diferentes tipos de superficies, y adherirse a ellas. Esta capacidad es la que le permite colonizar diverso material hospitalario, como catéteres (123), lo que facilita las infecciones nosocomiales causadas por esta bacteria. Además de a superficies inertes, también es capaz de adherirse a superficies vivas, como por ejemplo, células epiteliales (124). Esta adherencia conlleva a la formación de biofilms, los cuales son estructuras multicelulares complejas en los que las bacterias se encuentran fijadas a un sustrato, embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que está formada por sustancias poliméricas, como exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y otras sustancias (125). La formación de biofilms es frecuente en cepas clínicas de *A. baumannii* (126), y es un factor importante para la colonización y persistencia, tanto en tejidos infectados como en material hospitalario. Además, confiere resistencia a antibióticos (124, 127), ya que las bacterias, en su interior, se encuentran protegidas, siendo también más resistentes a la desecación y al estrés ambiental.
- Captación de hierro a partir de grupos hemo y mediante sideróforos: El ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) está poco disponible para las bacterias debido a su baja solubilidad en condiciones aeróbicas y por su captación por moléculas como los grupos hemo o por proteínas de alta afinidad por el hierro como la transferrina. *A. baumannii* contiene en su genoma genes que codifican para productos cuya función es la captura de hierro a partir de grupos hemo, los cuales están disponibles para su captación en zonas donde existe daño celular y tisular causado por infecciones, como por ejemplo en casos de fascitis necrotizante (128) o en casos de pacientes gravemente

heridos (1). También se han descrito sideróforos en *A. baumannii*, proteínas de unión a hierro responsables de su captación. El sistema mejor descrito es el mediado por el sideróforo acinetobactina, descrito por primera vez en la cepa ATCC 19606 (129). Estudios recientes han demostrado que la producción de un sistema de adquisición de hierro mediado por acinetobactina es indispensable para la persistencia y la capacidad de causar citotoxicidad de esta cepa, así como de causar muerte en modelos animales, quedando reflejado de esta manera su papel crucial en virulencia (130).

- Factores de virulencia: En comparación con otros patógenos gram negativos, en *A. baumannii* se han identificado pocos factores de virulencia. Se han descrito los siguientes:
  - Porinas: OmpA es, sin duda, el mejor descrito de los factores de virulencia de *A. baumannii*. Se ha visto que es capaz de causar apoptosis y citotoxicidad dañando las mitocondrias y el núcleo en células eucariotas (131, 132). Esta proteína forma parte de las OMVs, mediante las cuales alcanzaría las células eucariotas, pudiendo así ejercer su efecto citotóxico (133). Además de ser un factor de virulencia de por sí, OmpA interviene en la formación de biofilm y en la adherencia de *A. baumannii* (134, 135). Por otra parte, la porina Omp33-36 también está implicada en la virulencia de *A. baumannii*, ya que juega un papel importante en la adherencia bacteria-células eucariotas mediante su unión a fibronectina (135). Además, Smani *et al.* (136) demostraron que esta porina es clave en la patogénesis de *A. baumannii*, tanto *in vivo* como *in vitro*, aunque su mecanismo de acción no fue estudiado. OprD y CarO también parecen estar implicadas en virulencia, aunque su papel es desconocido. Una baja expresión de los genes que codifican para ambas porinas implica una reducción en la virulencia de *A. baumannii* (137).

- Fosfolipasas C y D: En el genoma de *A. baumannii* se han detectado dos genes que codifican para ambas enzimas. La fosfolipasa C produce un aumento de la citotoxicidad en células eucariotas (138), mientras que la fosfolipasa D se ha visto que es crucial para la resistencia al suero humano, la invasión de células epiteliales y la patogénesis en modelos animales (139). Estas enzimas intervienen en la patogénesis participando en la lisis de las células eucariotas, escindiendo los fosfolípidos de la membrana plasmática.
- Lipopolisacárido y polisacárido capsular: Ambos han sido considerados factores de virulencia en *A. baumannii*. El lipopolisacárido activa la respuesta inmune innata (140). Además, se ha visto que mutantes carentes de LpsB presentan una disminución de la resistencia al suero y descenso en la supervivencia en modelos animales (140). El polisacárido capsular parece tener un papel relevante en la protección de la bacteria frente a la respuesta inmune (141). Cepas mutantes por inserción en los genes *ptk* o *epsA* presentaban una reducción en el crecimiento en suero humano y líquido ascítico, y se ha observado que tienen una menor persistencia en modelos de infección en rata.
- PBPs: Además de en resistencia, también pueden estar implicadas en virulencia. Cepas mutantes para el gen *pbpG*, que codifica para la PBP7/8, presentan una reducción en la resistencia al suero y en la virulencia en modelos animales (142).
- OMVs: Como se explicará más adelante, las OMVs tienen un papel crucial en la patogenicidad, presentando diversas funciones entre las que están liberar factores de virulencia. *A. baumannii* secreta OMVs, y éstas portan OmpA, de forma que participan en su liberación en eucariotas, como ya se ha comentado (133).

**Tabla 2:** Principales factores de virulencia presentes en *A. baumannii*. Tabla adaptada de la referencia (25).

<b>Factor de virulencia</b>	<b>Función en patogénesis</b>
OmpA	Inducción de apoptosis en células eucariotas, adherencia e invasión de células epiteliales, formación de biofilm, motilidad en superficies, resistencia al suero
Lipopolisacárido	Evasión de la respuesta inmune, activación de la respuesta inmune
Polisacárido capsular	Evasión de la respuesta inmune, crecimiento en suero
Fosfolipasa D	Resistencia al suero, diseminación bacteriana, supervivencia <i>in vivo</i> bacteriana
PBP7/8	Biosíntesis del peptidoglicano, estabilidad celular, crecimiento en suero
OMVs	Liberación de factores de virulencia al citoplasma de las células eucariotas, transferencia de material genético entre bacterias
Sistema de adquisición de hierro mediante acinetobactina	Proporción del hierro necesario para la persistencia en el huésped, inducción de apoptosis

### 1.6. Interacción huésped-patógeno: papel de las OMVs y respuesta del huésped

Las bacterias patógenas gram negativas, durante la infección, secretan productos que aumentan la supervivencia bacteriana y provocan daños en el huésped. Esta secreción es de por sí un proceso complejo debido a las características de la envuelta bacteriana, formada por dos membranas lipídicas, la interna y la externa, con el periplasma y la pared de peptidoglicano entre ellas. Las bacterias han desarrollado numerosas estrategias para permitir que los factores de virulencia accedan a las células del huésped, alterando la biología de las células y permitiendo la colonización bacteriana. Estos mecanismos requieren que exista contacto entre la bacteria y las células. Así, por ejemplo, los sistemas de secreción Tipo III y Tipo IV liberan proteínas directamente en el citoplasma de las células eucariotas (143). Mediante estos sistemas se secretan proteínas individuales o pequeños complejos.

Además de éstos, existe otro mecanismo mediante el cual las bacterias pueden excretar al medio grandes y complejos grupos de proteínas y lípidos sin que haya necesidad de contacto bacteria-célula: las OMVs. Estas estructuras presentan diversas funciones, como transportar moléculas del *quorum-sensing*

(144), transporte de toxinas (145, 146), formación de biofilms (147), y transferencia de genes (148, 149). Las mejor caracterizadas pertenecen a patógenos, cuyo análisis ha demostrado que mediante este sistema transportan factores de virulencia. Además, existe diferencia entre la cantidad de OMVs producidas por bacterias patógenas y las producidas por no patógenas, siendo mayor la cantidad producida por las patógenas (150, 151), quedando así de manifiesto la implicación e importancia de las OMVs en virulencia.

### 1.6.1. OMVs y virulencia

Las OMVs son un potente mecanismo de virulencia. OMVs procedentes tanto de patógenos intracelulares como extracelulares han sido identificadas en diferentes tejidos del huésped, poniéndose así de manifiesto su capacidad para acceder a una gran variedad de ambientes (108). Además, han sido detectadas en diferentes fluidos de individuos infectados, demostrándose así su capacidad para diseminarse a lugares alejados del foco de infección. Así, por ejemplo, OMVs de *Borrelia burgdorferi* fueron detectadas en orina y sangre de ratones infectados (152).

En bacterias patógenas son especialmente importantes para la infección, presentando diversas funciones, como transportar toxinas, establecer un nicho de colonización, o modular la respuesta y la defensa del huésped.

Estas estructuras presentan factores en su superficie que pueden mediar la adhesión con las células eucariotas, lo que permite la liberación de su contenido al interior celular (108). La manera en que sucede esta fusión entre membranas no ha sido explicada. Estudios en *E. coli* sugieren que las OMVs se fusionan en zonas determinadas de la membrana plasmática eucariota, concretamente en las denominadas balsas lipídicas, microdominios ricos en colesterol y menos fluidos que su entorno (153).

El transporte de toxinas activas está asociado a OMVs y, en muchas ocasiones, presentan un enriquecimiento de las mismas. Además, las toxinas



suelen ser más activas cuando aparecen asociadas a OMVs que cuando son liberadas al exterior por sí solas, y la respuesta de las células eucariotas es diferente según como se presenta la toxina (108). Ejemplos de toxinas asociadas a OMVs son la toxina Shiga de *E. coli* (149), VacA de *Helicobacter pylori* (154) o la toxina Cif en *P. aeruginosa* (155).

Las OMVs contienen componentes que son reconocidos por las células eucariotas y disparan la respuesta inmune. Una respuesta inflamatoria hiperestimulada es destructiva para el huésped, y los lipopolisacáridos y las proteínas de membrana externa presentes en las OMVs pueden activar las células inmunes vía receptores de tipo Toll induciendo la migración de leucocitos (156). De esta forma, incluso las OMVs que no porten toxinas pueden causar daño. Además de producir esta reacción, las OMVs pueden permitir a las bacterias evitar la detección del sistema inmune durante la colonización, como se ha visto, por ejemplo, en *Neisseria gonorrhoeae* (157).

Por otra parte, las OMVs no solo son importantes en virulencia por su mecanismo contra las células eucariotas. También es importante el efecto que tienen sobre otras bacterias. Así, muchas bacterias usan las OMVs como una forma de obtener ventaja sobre otras en un ambiente de competencia directa, liberando toxinas que pueden afectar a otras bacterias tanto gram negativas como gram positivas, pero que son inocuas para su especie. Se ha visto en *P. aeruginosa* que sus OMVs son bacteriolíticas (110). Se demuestra de esta forma que las OMVs permiten a las bacterias obtener un nicho en un ambiente competitivo con otras bacterias, como puede ser la colonización de un huésped.

### **1.6.2. Respuesta del huésped ante la infección bacteriana: apoptosis y autofagia**

La defensa contra los patógenos requiere de la coordinación de múltiples vías de señalización. Durante la infección, las células eucariotas reconocen moléculas extrañas o peligrosas, y mediante receptores, pueden desencadenar



una cascada de señales intracelulares que llevan a la activación de mecanismos antimicrobianos para eliminar la infección (158).

La muerte celular, que es un proceso que ocurre muy frecuentemente durante las infecciones, es también un mecanismo de defensa en sí mismo. La muerte de la célula puede traer consigo la muerte del patógeno, lo cual ayuda a la eliminación de la infección. Mediante la destrucción del tejido infectado se elimina el nicho del patógeno, por lo que se dificulta su replicación y su diseminación (159).

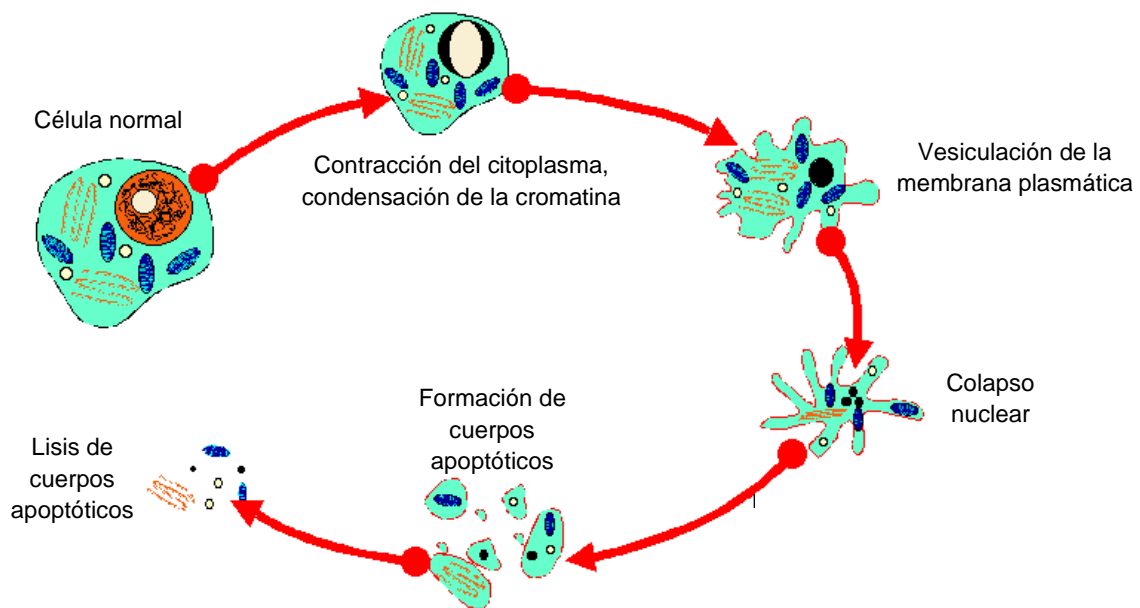
Se han descrito diferentes mecanismos de muerte celular causados por bacterias, y que sea una u otra la que se desarrolle dependerá de diferentes factores, entre los que se incluyen la naturaleza del patógeno, la carga del mismo y el lugar de infección (159). Un tipo de muerte celular no tiene por qué excluir a otro, ya que se pueden dar de forma simultánea. La apoptosis y la autofagia son dos de estos mecanismos. Mientras que la apoptosis es un tipo de muerte celular programada en el cual la célula eucariota se “suicida”, la autofagia, en un principio, es un mecanismo que tiene como fin la supervivencia de la célula, aunque episodios de autofagia masiva llevan a la muerte celular.

### **1.6.2.1. Apoptosis**

La apoptosis es el mecanismo de muerte celular programada más estudiado, en el cual las células se destruyen sin desencadenar ningún tipo de reacción inflamatoria. Presenta un papel importante durante el desarrollo, la homeostasis y también en la regulación de la respuesta de las células frente a determinados patógenos (160-163). La apoptosis provoca una serie de cambios morfológicos en la célula (Figura 3) como son la reducción de su tamaño, vesiculación de la membrana, la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo y del propio ADN (164, 165). Finalmente, la célula se fragmenta en pequeñas estructuras compactas denominadas cuerpos apoptóticos, los cuales son eliminados por los macrófagos. La apoptosis puede ser desencadenada por determinados estímulos, tanto internos como externos a

la célula. Estos estímulos pueden activar una familia de cisteín-proteasas denominadas caspasas, las cuales son inicialmente sintetizadas como enzimas inactivas denominadas procaspasas (166-168). Las procaspasas pueden ser divididas en dos grupos: procaspasas iniciadoras, en las cuales se incluyen las procaspasas 2, 8, 9 y 10; y las procaspasas efectoras, en las cuales se incluyen las procaspasas 3, 6 y 7.

El complejo de receptores de muerte y ligandos específicos en la superficie de la célula activa la caspasa 8, la cual activa a las caspasas efectoras 3, 6 y 7, induciéndose de esta manera la apoptosis. Algunas señales apoptóticas desencadenan cambios en las mitocondrias, lo cual lleva a la liberación del citocromo c por parte de las mismas al citosol. En el citosol, el citocromo c se une al factor activador de apoptosis 1 (Apaf-1) y activa la caspasa 9, la cual activa las caspasas efectoras 3, 6 y 7 (169, 170).



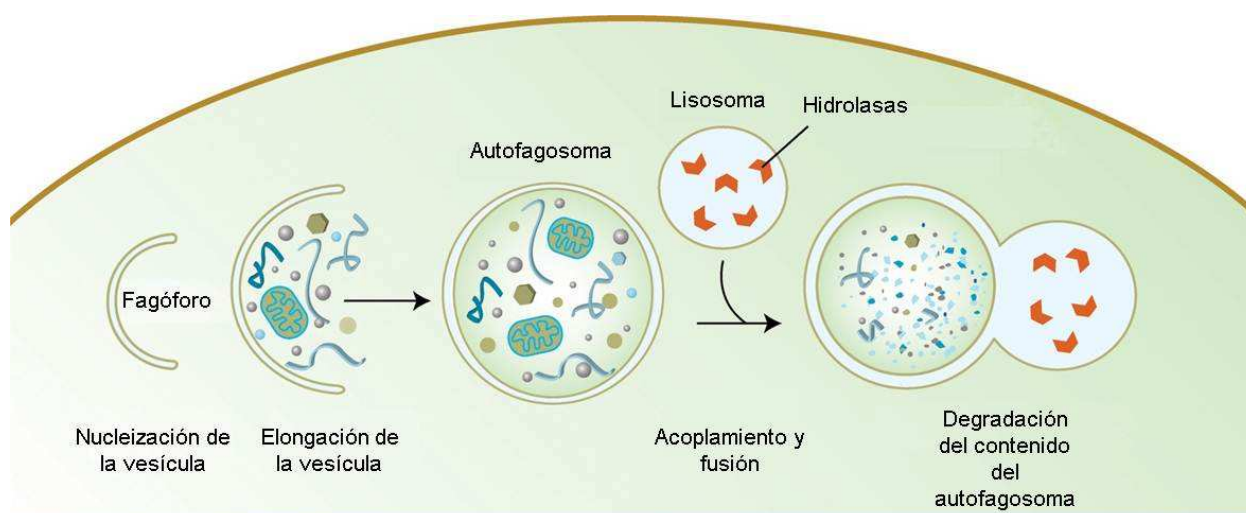
**Figura 3:** Esquema de los cambios morfológicos en las células eucariotas asociados a la apoptosis. Figura adaptada de [www.microbiologybytes.com](http://www.microbiologybytes.com).

Se han descrito varios patógenos capaces de provocar apoptosis en eucariotas. Este mecanismo es activado a través de la producción de toxinas o la expresión de factores de virulencia que interactúan directamente con componentes clave para la activación del proceso apoptótico (171). Así, como ya

se ha explicado, en *A. baumannii* se ha descrito que OmpA es capaz de causar apoptosis en células eucariotas a partir de daños en la mitocondria (131).

### 1.6.2.2. Autofagia

La autofagia es un proceso asociado al mantenimiento de la homeostasis celular, en el cual se degradan constituyentes de la propia célula, como por ejemplo, proteínas mal plegadas, orgánulos viejos o defectuosos, o incluso cualquier componente citoplasmático al azar (172). Este proceso está coordinado por un grupo de proteínas especializadas denominadas Atg, que inicialmente fueron descritas en levaduras (173). La autofagia se origina a partir de un estímulo que va a provocar que se lleven a cabo una serie de reordenamientos de membranas en el interior de la célula que llevan al secuestro de diferentes componentes del citoplasma por parte de unas estructuras denominadas fagóforos, cuyo origen se cree que pueden ser zonas especializadas del retículo endoplasmático (173). La membrana aislada se elonga y rodea el objetivo formando el autofagosoma, un orgánulo de doble membrana característico de este proceso (174). El autofagosoma finalmente se acaba fusionando con el lisosoma, donde su contenido es degradado (Figura 4).



**Figura 4:** Diferentes fases del proceso autofágico. Figura adaptada de la referencia (182).

En el desarrollo del proceso autofágico están implicadas muchas proteínas. Dos de ellas son p62 y LC3B. La proteína adaptadora p62 es degradada selectivamente durante la autofagia (175), y se acumula en el citoplasma de las células eucariotas cuando el proceso autofágico es inhibido (176). Por otra parte, cuando la autofagia es activada, los niveles de esta proteína decrecen. LC3B es una proteína que participa en la maduración del autofagosoma, y puede ser encontrada de dos formas: LC3B-I (en el citosol) y LC3B-II (unida a la membrana del autofagosoma).

La función principal de la autofagia es la adaptación a condiciones de escasez de nutrientes, de forma que así, aprovechan sus propios materiales para generarlos (172). Pero este proceso también puede ser activado por patógenos, ya que la autofagia es una manera efectiva de eliminar patógenos intracelulares, como *Mycobacterium tuberculosis* y *Streptococcus* del grupo A (177, 178). Una vez que los patógenos invaden la célula, la respuesta autofágica es activada, de forma que éstos son atrapados por los autofagosomas para ser finalmente degradados en autolisosomas. Sin embargo, algunos patógenos han desarrollado estrategias para modificar y usar este mecanismo en su propio beneficio, de forma que se han identificado dos métodos (179): En el primero de ellos, algunos microorganismos son capaces de permanecer en el interior de los autofagosomas, impidiendo su maduración en los lisosomas, lo cual garantiza la continuación de la infección (180). En el segundo de ellos, más complejo, los patógenos toman el control del proceso autofágico normal, de forma que obtienen ventajas para su supervivencia y replicación (181). Así, bacterias como *Legionella pneumophila* o *Coxiella burnetii* (179), utilizando los autofagosomas como su nicho intracelular, manipulan la autofagia a nivel molecular como estrategia para conseguir una infección persistente. Otra ventaja que les proporciona es la adquisición de nutrientes en los compartimentos autofágicos, los cuales son una fuente continua de péptidos y aminoácidos, que pueden ser captados por la bacteria (181, 182).

## 2. OBJETIVOS

---



## 2. OBJETIVOS

Como se ha descrito anteriormente, *A. baumannii* ha emergido en los últimos años como un importante patógeno nosocomial debido, por un lado, a la multirresistencia a antibióticos que ha desarrollado y, por otro, a la gravedad de las infecciones causadas por este microorganismo. Por esta razón, es de vital importancia el estudio de los diferentes mecanismos que hacen que esta bacteria sea tan eficaz en el desarrollo de este tipo de infecciones.

Los objetivos principales de la presente tesis doctoral tuvieron como finalidad el estudio de diferentes aspectos de *A. baumannii*. Se analizó el papel de diferentes mecanismos de resistencia en el fenotipo multirresistente de cepas clínicas, se describió un nuevo mecanismo de transferencia de genes de resistencia a través de OMVs y se identificó una porina, la Omp33-36, como un nuevo factor de virulencia de esta bacteria.

Los objetivos concretos de cada capítulo fueron los siguientes:

### 2.1. Objetivos del capítulo 1

- Investigar los mecanismos de resistencia a carbapenemas, aminoglucósidos, glicilglicinas, tetraciclinas y quinolonas presentes en 90 cepas clínicas multirresistentes de *A. baumannii* pertenecientes a dos clones no relacionados genéticamente.
- Analizar la interrelación o nexo de los diferentes mecanismos de resistencia en cepas clínicas de *A. baumannii* mediante el estudio de la expresión de las bombas de expulsión, porinas y  $\beta$ -lactamasas cromosómicas.

## 2.2. Objetivos del capítulo 2

- Analizar la presencia del gen *bla*<sub>OXA-24</sub> en las OMVs emitidas por cepas clínicas de *A. baumannii* resistentes a carbapenemas.
- Estudiar si las OMVs de cepas clínicas de *A. baumannii* resistentes a carbapenemas son capaces de transmitir el gen *bla*<sub>OXA-24</sub> a otras cepas sensibles, y transformarlas volviéndolas resistentes.

## 2.3. Objetivos del capítulo 3

- Analizar la estructura, función y localización de la porina Omp33-36 en *A. baumannii*.
- Determinar el papel de Omp33-36 en el desarrollo de citotoxicidad en diferentes tipos de células eucariotas.
- Estudiar la implicación de Omp33-36 en la patogénesis de *A. baumannii*.



## 3. CAPÍTULO

---



### 3. CAPÍTULOS

#### 3.1. Artículo I: Contribución de las bombas de expulsión, porinas y $\beta$ -lactamasas a la multirresistencia en aislados clínicos de *A. baumannii*

La multirresistencia desarrollada por cepas de *A. baumannii* ha emergido en las últimas décadas principalmente como resultado de una combinación de dos factores: por un lado, la gran plasticidad de su genoma (60); por otro, la mutación de genes endógenos provocando alteraciones que van asociadas a la resistencia a antimicrobianos, como la sobreexpresión de las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas AmpC (59) y OXA-51-like (183), la pérdida de expresión de las porinas (CarO y Omp33-36) (75, 77), la mutación en los genes *gyrA* y *parC* (89) y la sobreexpresión de bombas de expulsión (81).

En el año 2010, 444 cepas clínicas de *A. baumannii* procedentes de 42 hospitales fueron aisladas de 273 pacientes e identificadas para formar parte del 2º estudio multicéntrico de este patógeno en España (GEIH-REIPI-2010-Ab) (184). Las diferentes cepas fueron identificadas por MALDI-TOF (185) y ARDRA (186). La identificación a nivel de especie fue confirmada mediante la detección de los genes *OXA-51* por PCR (187) y *bsp* por RT-PCR (188, 189).

En este estudio se analizó la interrelación de los mecanismos de resistencia a carbapenemas, aminoglucósidos, glicilglicinas, tetraciclinas y quinolonas en 90 cepas clínicas multirresistentes aisladas de dos clones de *A. baumannii* no relacionados genéticamente y que mostraban gran variabilidad de resistencia antibiótica: el clon PFGE-ROC-1, procedente del hospital Virgen del Rocío de Sevilla, y el clon PFGE-HUI-1, procedente del hospital Insular de Gran Canaria. Como cepa de referencia para estudiar los diferentes mecanismos de resistencia, se utilizó la cepa *A. baumannii* ATCC 17978. La relación clonal entre las cepas fue determinada por electroforesis en campo pulsante (PFGE) (190, 191). Las cepas de cada clon también fueron analizadas por MLST (5). Se determinó que en el clon PFGE-ROC-1(ST-2), 53 cepas portaban la  $\beta$ -lactamasa

OXA-58, pasándose a designar PFGE-ROC-1<sub>OXA-58</sub>; y 18 cepas eran portadoras de la  $\beta$ -lactamasa OXA-24, pasándose a designar PFGE-ROC-1<sub>OXA-24</sub>. El clon PFGE-HUI-1(ST79) resultó ser susceptible a carbapenemas.

La susceptibilidad antibiótica fue determinada mediante microdilución, siguiendo las recomendaciones CLSI (184). Se estudió la variabilidad en las CMI<sub>s</sub> a glicilglicinas, aminoglucósidos, tetraciclinas, rifampicina y doripenem, obteniéndose los siguientes resultados:

- PFGE-ROC-1<sub>OXA-58</sub>: tigeciclina ( $\leq 0.25$ -2 mg/L), gentamicina (1->64 mg/L), amikacina (<2-64 mg/L), doxiciclina (16->64 mg/L), minociclina (1-8 mg/L), tetraciclina (>64 mg/L), netilmicina (1->64 mg/L), rifampicina (1-64 mg/L), tobramicina (<0.5-64) y doripenem (4-8 mg/L).
- PFGE-ROC-1<sub>OXA-24</sub>: tigeciclina ( $\leq 0.25$ -1 mg/L), gentamicina (2->64 mg/L), amikacina (<2-64 mg/L), doxiciclina (16-32 mg/L), minociclina (<0.5-4 mg/L), tetraciclina (>64 mg/L), netilmicina (64->64 mg/L), rifampicina (<0.5-4 mg/L), tobramicina (4-64 mg/L) y doripenem (64->64 mg/L).
- PFGE-HUI-1: tigeciclina (1-2 mg/L), gentamicina (16->64 mg/L), amikacina (4-64 mg/L), doxiciclina (<0.5-8 mg/L), minociclina (<0.5-1 mg/L), tetraciclina (4->64 mg/L), netilmicina (4->64 mg/L), rifampicina (2-32 mg/L), tobramicina (8-64 mg/L) y doripenem (<0.5-2 mg/L).

Mediante PCR, se detectaron en todos los clones la combinación de genes que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos *AacC1/AphA1/AadB*. También se detectaron genes *Tet* en ambos clones: *tetB* en todas las cepas de PFGE-ROC-1 y *tetA*(39) en la mayoría de las cepas PFGE-HUI-1.

Mediante secuenciación, en las cepas resistentes a quinolonas se detectaron mutaciones en *gyrA*, la cual provoca el cambio aminoacídico Ser<sub>83</sub>→Leu, y en *parC*, el cual provoca el cambio Ser<sub>80</sub>→Leu.

Se usó RT-PCR a tiempo real para analizar en las diferentes cepas la expresión de *adeB*(AdeABC), *adeJ*(AdeIJK), *adeG*(AdeFGH), *abeM*, *craA* y *amvA* (genes pertenecientes a sistemas de expulsión); *oprC*, *oprD*, *ompW*, *ompA*, *carO*, *omp33*, *dcap-like*, *oprB* y *omp25* (genes pertenecientes a porinas o proteínas de membrana externa); y, finalmente, los genes *OXA-51* y *ampC*, que codifican para  $\beta$ -lactamasas. Para cada cepa, las expresiones relativas (ER) fueron normalizadas utilizando los genes constitutivos *rpoB* y *gyrB*. Como cepa referencia, se utilizó *A. baumannii* ATCC 17978.

Los resultados mostraron expresiones relativas elevadas tanto del gen *adeB* (ER 20-40 veces) como de *adeJ* (ER 2,5-9) en aislamientos del clon PFGE-ROC-1. No fue posible detectar *adeB* en el clon PFGE-HUI-1.

La ER para *adeG*, *craA*, *abeM* y *amvA* en todas las cepas fue de entre 0.003 y 1. Por otro lado, la expresión de las porinas no mostró relación estadísticamente significativa con la resistencia a antibióticos en los clones PFGE-ROC-1 y PFGE-HUI-1. Sin embargo, en las cepas de PFGE-ROC-1<sub>OXA-24</sub>, la ER de los genes *carO* y *omp25* fue menor que en PFGE-ROC-1<sub>OXA-58</sub>, mientras que la ER de los genes *OXA-51* y *ampC* fue similar entre todas las cepas.

En definitiva, la relación estadística entre los valores de CMI y la ER de los diferentes genes de resistencia constitutivos junto con la presencia de genes adquiridos fue la que se describe a continuación:

- Carbapenemas (imipenem, meropenem y doripenem): La resistencia fue asociada a la presencia de las  $\beta$ -lactamasas tipo OXA (OXA-24 y OXA-58) en las cepas del clon PFGE-ROC-1.
- Aminoglucósidos: En las cepas resistentes a gentamicina del clon PFGE-ROC-1, el sistema AdeABC aparece sobreexpresado, combinado en muchas ocasiones con la presencia de acetilasas (AacC1/AphA1/AadB).

Además, en las cepas de ambos clones, la presencia de estas acetilasas fue asociada con resistencia a netilmicina, tobramicina y amikacina.

- Glicilciclinas: La resistencia a tigeciclina fue asociada a la sobreexpresión de sistemas RND (PAbetaN) y a la bomba de expulsión Tet(39). La presencia del inhibidor de sistemas RND PAbetaN en cepas del clon PFGE-HUI-1 fue asociada con un descenso en la resistencia a tigeciclina. Las bombas de expulsión AdeIJK y AdeABC en cepas del clon PFGE-ROC-1 fueron asociadas con la resistencia a minociclina. Sin embargo, PFGE-ROC<sub>OXA-58</sub> mostró resistencia a este antibiótico posiblemente debido a la sobreexpresión de las bombas de expulsión AdeIJK y TetB.
- Tetraciclinas: La resistencia a tetraciclinas fue asociada a las bombas de expulsión TetB y TetA(39). En cepas resistentes a doxiciclina, AdeIJK fue sobreexpresada junto con los sistemas Tet.
- Quinolonas: Las mutaciones de los genes *gyrA* y *parC* fueron las causantes de la resistencia a ciprofloxacino.

En la tabla 3 se resumen todos estos resultados.

Mediante secuenciación, se estudió la presencia de mutaciones en los genes reguladores *adeR/adeS* (asociados al sistema de expulsión AdeABC) y *adeN* (asociado al sistema de expulsión AdeIJK), ya que tanto *adeB* como *adeJ* aparecían sobreexpresados. Todas las cepas de PFGE-ROC-1 que sobreexpresaban la bomba AdeABC presentaron mutaciones en *adeS* causantes de 3 cambios aminoacídicos (Ala<sub>94</sub>→Val, Gly<sub>186</sub>→Val y Phe<sub>214</sub>→Leu) y una mutación en *adeR* causante de un cambio (Ala<sub>136</sub>→Val). Solo dos cepas de este clon presentaron mutaciones en el gen regulador de la bomba de expulsión AdeIJK *adeN* (causantes de los cambios His<sub>111</sub>→Pro; Ile<sub>112</sub>→Phe). Los genes *adeS* y *adeR* en el clon PFGE-HUI-1 no pudieron ser amplificados. En todas las cepas de este clon, el gen *adeN* presentó una mutación (causando el cambio Pro<sub>16</sub>→Lys).

**Tabla 3:** Interrelación entre los diferentes mecanismos de resistencia a diversos antibióticos en las cepas de los clones PFGE-ROC-1 y PFGE-HUI-1.

Antibiótico	PFGE-ROC-1 <sub>OXA-58</sub>	PFGE-ROC-1 <sub>OXA-24</sub>	PFGE-HUI-1
Tigeciclina	Sobreexpresión de AdelJK	Sobreexpresión de AdeABC	Nuevo sistema de expulsión RND/bomba de expulsión TetA(39)
Gentamicina	Sobreexpresión de AdeABC/ Acetilasa (aacC1/aphA1/aadB)	Sobreexpresión de AdeABC/Acetilasa (aacC1/aphA1/aadB)	Acetilasa (aacC1/aphA1/aadB)
Minociclina	Sobreexpresión de AdelJK / Bomba de expulsión TetB	Sobreexpresión de AdeABC	-
Netilmicina, tobramicina y amikacina	Acetilasa (aacC1/aphA1/aadB)	Acetilasa (aacC1/aphA1/aadB)	Acetilasa (aacC1/aphA1/aadB)
Imipenem, meropenem y doripenem	$\beta$ -lactamasa OXA-58	$\beta$ -lactamasa OXA-24	-
Ciprofloxacino	Mutaciones en <i>gyrA</i> y <i>parC</i>	Mutaciones en <i>gyrA</i> y <i>parC</i>	Mutaciones en <i>gyrA</i> y <i>parC</i>
Doxiciclina	Sobreexpresión de AdelJK/ bomba de expulsión TetB	Bomba de expulsión TetB	Bomba de expulsión TetA(39)
Tetraciclinas	Bomba de expulsión TetB	Bomba de expulsión TetB	Bomba de expulsión TetA(39)







## Contribution of Efflux Pumps, Porins, and $\beta$ -Lactamases to Multidrug Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*

C. Rumbo,<sup>a</sup> E. Gato,<sup>a</sup> M. López,<sup>a</sup> C. Ruiz de Alegría,<sup>b</sup> F. Fernández-Cuenca,<sup>c</sup> L. Martínez-Martínez,<sup>b</sup> J. Vila,<sup>d</sup> J. Pachón,<sup>e</sup> J. M. Cisneros,<sup>e</sup> J. Rodríguez-Baño,<sup>c</sup> A. Pascual,<sup>c</sup> G. Bou,<sup>a</sup> M. Tomás,<sup>a</sup> on behalf of the Spanish Group of Nosocomial Infections and Mechanisms of Action and Resistance to Antimicrobials (GEIH-GEMARA) from the Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC) and the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI)

Department of Microbiology, Complejo Hospitalario Universitario a Coruña-INIBIC, La Coruña, Spain<sup>a</sup>; Department of Clinical Microbiology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, Spain<sup>b</sup>; Clinical Unit of Infectious Diseases and Microbiology, Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville, Spain<sup>c</sup>; Department of Clinical Microbiology, Hospital Clinic-CRESIB, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain<sup>d</sup>; Institute of Biomedicine of Seville (IBIS), University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Seville, Spain<sup>e</sup>

We investigated the mechanisms of resistance to carbapenems, aminoglycosides, glycolylcyclines, tetracyclines, and quinolones in 90 multiresistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from two genetically unrelated *A. baumannii* clones: clone PFGE-ROC-1 (53 strains producing the OXA-58  $\beta$ -lactamase enzyme and 18 strains with the OXA-24  $\beta$ -lactamase) and clone PFGE-HUI-1 (19 strains susceptible to carbapenems). We used real-time reverse transcriptase PCR to correlate antimicrobial resistance (MICs) with expression of genes encoding chromosomal  $\beta$ -lactamases (AmpC and OXA-51), porins (OmpA, CarO, Omp33, Dcap-like, OprB, Omp25, OprC, OprD, and OmpW), and proteins integral to six efflux systems (AdeABC, AdeIJK, AdeFGH, CraA, AbeM, and AmvA). Overexpression of the AdeABC system (level of expression relative to that by *A. baumannii* ATCC 17978, 30- to 45-fold) was significantly associated with resistance to tigecycline, minocycline, and gentamicin and other biological functions. However, hyperexpression of the AdeIJK efflux pump (level of expression relative to that by *A. baumannii* ATCC 17978, 8- to 10-fold) was significantly associated only with resistance to tigecycline and minocycline (to which the TetB efflux system also contributed). TetB and TetA(39) efflux pumps were detected in clinical strains and were associated with resistance to tetracyclines and doxycycline. The absence of the AdeABC system and the lack of expression of other mechanisms suggest that tigecycline-resistant strains of the PFGE-HUI-1 clone may be associated with a novel resistance-nodulation-cell efflux pump (decreased MICs in the presence of the inhibitor Phe-Arg  $\beta$ -naphthylamide dihydrochloride) and the TetA(39) system.

*Acinetobacter baumannii* is an important pathogen that causes nosocomial infections associated with high morbidity and mortality (1). Multidrug-resistant (MDR) strains of *A. baumannii* have emerged in the last few decades as a result of the combination of two main factors: (i) a high level of genomic plasticity (2) and (ii) mutation of endogenous genes, alteration of which is associated with antimicrobial resistance, such as overexpression of the chromosomally encoded ADC  $\beta$ -lactamase (AmpC) (3) and the OXA-51-like  $\beta$ -lactamase (4), loss of expression of porins (CarO and Omp33) (5, 6), mutation in the *gyrA* and *parC* genes (7), and overexpression of efflux systems (8).

Overexpression of the OXA-51-like  $\beta$ -lactamase has been associated with resistance to carbapenems and decreased expression of CarO and Omp33 (5, 6, 9).

Efflux pumps have multifactorial roles. These mechanisms are important for detoxification of intracellular metabolites, bacterial virulence (in both animal and plant hosts), intercellular signaling and trafficking, and cell homeostasis (10). Three resistance-nodulation-cell division (RND) systems, AdeABC, AdeIJK, and AdeFGH, have been characterized and reported to cause MDR in *A. baumannii* (8). AdeABC is the RND system most frequently involved in MDR in clinical strains; it has been found in approximately 80% of clinical isolates (the rates reported vary from 53% to 97%) (11) but was not detected in 32 environmental isolates (12). AdeRS is a two-component system that regulates AdeABC expression (13). Mutations in this system and the presence of an *ISAbal* insertion sequence in this system can lead to overexpression of the AdeABC operon (13–15). However, strains of *A. bau-*

*mannii* that express AdeABC without mutations have been found in association with AdeRS (16, 17). Recently, the *adeN* gene has been found to be associated with the regulation of the AdeIJK system (18), and mutations in the *adel* gene have been associated with overexpression of the AdeFGH pump (11). Three other types of efflux systems have been described in *A. baumannii*: CraA (a major facilitator superfamily [MFS] pump), which confers intrinsic chloramphenicol resistance (19); AbeM (a member of the multidrug and toxic compound extrusion [MATE] family of pumps), which extrudes several antimicrobials and biocides (20); and AmvA (an MFS pump), which confers resistance to detergents, disinfectants, dyes, and erythromycin. Overexpression of the AmvA efflux pump has been associated with increased drug resistance in *A. baumannii* clinical isolates (21). Finally, several tetracycline efflux pumps (systems acquired from the MFS superfamily) have been described in *A. baumannii*. The most prevalent of these are TetA, which is associated with resistance to tetracycline, and TetB, which is implicated in resistance to tetracycline, doxy-

Received 10 April 2013 Returned for modification 19 May 2013

Accepted 3 August 2013

Published ahead of print 12 August 2013

Address correspondence to G. Bou, German.Bou.Arevalo@sergas.es, or M. Tomás, MA.del.Mar.Tomas.Carmona@sergas.es.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.00730-13

cycline, and minocycline (8). TetA(39) is an important tetracycline resistance mechanism in clinical strains (22).

Because of the complexity of clinical strains of *A. baumannii*, many researchers have used ATCC reference strains to investigate the mechanisms of resistance. However, very few studies have analyzed the combinations of mechanisms and their interrelation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Here, we studied the interplay between the mechanisms of multidrug resistance in clinical *A. baumannii* strains, particularly those involving efflux pumps, the influx of antimicrobials, and chromosomally encoded  $\beta$ -lactamases.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial isolates and molecular typing.** In 2010, 444 strains of *A. baumannii* were isolated (from 273 patients) in 42 participating hospitals and identified as part of the second multicenter study on this pathogen in Spain (GEIH-REIPI-2010-Ab) (23). The strains were identified by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (24) and amplified rRNA gene restriction analysis (ARDRA) (25). Species identification was confirmed by detection of the OXA-51 gene by PCR (26) and also by detection of the *bsp* gene (a novel target) by real-time quantitative PCR (27, 28).

The clonal relationship between all strains displaying various levels of antibiotic susceptibility ( $n = 71$ ) from a hospital in southern Spain and a hospital in the Canary Islands ( $n = 19$ ) was determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (29, 30) of samples of chromosomal DNA digested with *Apal* (Roche, Mannheim, Germany) and embedded in low-melting point agarose. The restriction fragments thus obtained were separated in a CHEF DR-III system (Bio-Rad, Hercules, CA). PFQuest II software, version 4.5 (Bio-Rad), was used to analyze the band patterns in the agarose gel electrophoresis images (cutoff = 85%). Strains of both clones were analyzed by multilocus sequence typing, according to the system developed by Nemec and coworkers (31).

**Susceptibility testing.** The antibiotic susceptibility profile was determined according to CLSI recommendations (23). In strains of the PFGE-HUI-1 clone, we determined MICs in the presence of Phe-Arg  $\beta$ -naphthylamide dihydrochloride (PAbetaN; a commonly assumed inhibitor of the RND efflux pump) (32).

**DNA amplifications studies.** We used PCR to detect the genes coding for common aminoglycoside-modifying enzymes (AacA4, AacC1, AacC2, AadB, AadA1, AphA1, AphA6, and AadA2) (33); CHDL enzymes (OXA-23, -24, -51, -58, and -143) (34, 35); MBL enzymes (IMP, VIM, SPM-1, GIM-1, SIM-1, BIC, DIM, and NDM) (36); extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs), such as GES enzymes; and carbapenemases, such as KPC enzymes. We sequenced the *gyrA* and *parC* genes to study the presence of the mutations. Finally, we analyzed the *tet* genes most commonly detected in isolates of *A. baumannii* [*tetA*, *tetB*, *tetA*(34), and *tetA*(39)] (37, 38).

**Real-time RT-PCR studies.** We used real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) to examine all isolates for expression of *adeB*, *adeI*, *adeG*, *abeM*, *craA*, and *amvA* (genes belonging to efflux pumps systems); *oprC*, *oprD*, *ompW*, *ompA*, *carO*, *omp33*, *dcap*-like, *oprB*, and *omp25* (genes harboring porins or outer membrane protein); and finally, the OXA-51 and *ampC*  $\beta$ -lactamase genes. We obtained DNase-treated RNA from late-log-phase cultures (optical density = 0.4 to 0.6 absorbance units) by using a High Pure RNA isolation kit (Roche, Germany) and 50 ng of RNA. Analysis of controls without reverse transcriptase confirmed the absence of contaminating DNA in the samples. We used a LightCycler 480 RNA master hydrolysis probe (Roche, Germany) for the RT-PCR studies. The Universal Probe Library (UPL) TaqMan probes (Roche, Germany) and primers used are listed in Table 1. All were designed from conserved regions of DNA after the alignment of the genomes of the following strains of *A. baumannii*: AB 307-0294, AB 0057, ACICU, SDF, AYE, and ATCC 17978. We adjusted the concentrations of the samples to achieve efficiencies of 90% to 110% and performed all experiments in triplicate from

three RNA extractions. For each strain, we normalized the levels of expression of all genes relative to those of the single-copy housekeeping genes *rpoB* and *gyrB*. We then calibrated the normalized expression of each gene of interest relative to its expression by *A. baumannii* ATCC 17978, which was assigned a value of 1.0.

**Sequencing of the genes regulating AdeABC and AdeIJK efflux pumps.** We sought mutations in the regulatory genes *adeR-adeS* and *adeN*, which have previously been associated with upregulation of the AdeABC and AdeIJK efflux systems, respectively. We amplified the genes by using the primers listed in Table 1. We used the Macrogen program (Macrogen Europe, Amsterdam, Netherlands) for DNA sequencing and the NCBI BLAST ([www.ncbi.nlm.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST)) and CLUSTAL ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)) programs for posterior analyses.

**Statistical analysis.** We categorized the strains into two groups according to antimicrobial susceptibility (not following the CLSI or EUCAST clinical breakpoints). We worked with the Student's *t* test to compare differences in gene expression between groups and thus evaluate any associations with antibiotic resistance. Differences were considered significant at a *P* value of <0.05.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The nucleotide sequences of the *adeR*, *adeS*, and *adeN* genes from strains of the PFGE-ROC-1 clone were submitted to the GenBank database and have been assigned accession numbers KF147860, KF147861, and KF147862, respectively.

## RESULTS

**MICs, typing, and PCR detection of genes of the isolates.** To study the expression levels of efflux pump systems, porins, and chromosomal  $\beta$ -lactamases, we selected clonally related strains with different antibiotic susceptibilities (39). In Spain, OXA-type enzymes are prevalent in carbapenem-resistant strains of *A. baumannii* (40, 41). Isolates of *A. baumannii* from two hospitals in Spain that showed some clonal relation were designated clone PFGE-ROC-1 (sequence type 2 [ST2]) ( $n = 71$ ; Fig. 1) and clone PFGE-HUI-1 (ST79) ( $n = 19$ ; Fig. 2). Moreover, 53 strains of the PFGE-ROC-1 clone carried the OXA-58  $\beta$ -lactamase gene (designated PFGE-ROC-1<sub>OXA-58</sub>; imipenem MICs, 8 to 64 mg/liter; meropenem MICs, 8 to 16 mg/liter) and 18 isolates carried the OXA-24  $\beta$ -lactamase gene (designated PFGE-ROC-1<sub>OXA-24</sub>; imipenem MICs,  $\geq 64$  mg/liter; meropenem MICs, 32 to 64 mg/liter). The isolates of clone PFGE-HUI-1 ( $n = 19$ ) were susceptible to carbapenems. We studied the variability in the MICs of glycolcyclines, aminoglycosides, tetracyclines, rifampin, and doripenem for all isolates, with the following results: (i) for PFGE-ROC-1<sub>OXA-58</sub> (Table 2) tigecycline MICs were  $\leq 0.25$  to 2 mg/liter, gentamicin MICs were 1 to  $> 64$  mg/liter, amikacin MICs were  $< 2$  to 64 mg/liter, doxycycline MICs were 16 to  $> 64$  mg/liter, minocycline MICs were 1 to 8 mg/liter, tetracycline MICs were  $> 64$  mg/liter, netilmicin MICs were 1 to  $> 64$  mg/liter, rifampin MICs were 16 to 64 mg/liter, tobramycin MICs were  $< 0.5$  to 64, and doripenem MICs were 4 to 8 mg/liter. (ii) For PFGE-ROC-1<sub>OXA-24</sub> (Table 3), tigecycline MICs were  $\leq 0.25$  to 1 mg/liter, gentamicin MICs were 2 to  $> 64$  mg/liter, amikacin MICs were  $< 2$  to 64 mg/liter, doxycycline MICs were 16 to 32 mg/liter, minocycline MICs were  $< 0.5$  to 4 mg/liter, tetracycline MICs were  $> 64$  mg/liter, netilmicin MICs were 64 to  $> 64$  mg/liter, rifampin MICs were  $< 0.5$  to 4 mg/liter, tobramycin MICs were 4 to 64 mg/liter, and doripenem MICs were 64 to  $> 64$  mg/liter. (iii) For PFGE-HUI-1 (Table 4), tigecycline MICs were 1 to 2 mg/liter, gentamicin MICs were 16- to  $> 64$  mg/liter, amikacin MICs were 4 to 64 mg/liter, doxycycline MICs were  $< 0.5$  to 8 mg/liter, minocycline MICs were  $< 0.5$  to 1 mg/liter, tetracycline MICs were 4 to  $> 64$  mg/liter, netilmicin MICs were 4 to  $> 64$  mg/liter, rifampin MICs were 2 to 32 mg/liter, tobramycin MICs were 8 to 64 mg/liter, and doripenem MICs were  $< 0.5$  to 2 mg/liter.

TABLE 1 Primers used in this study

Analysis and gene	Orientation	Primer sequence (5'–3')	UPL probe <sup>a</sup>	Reference or source
RT-PCR analysis				
<i>rpoB</i>	Forward	CGTGTATCTGCGCTTGG	131	This study
	Reverse	CGTACTTCGAAGCCTGCAC		
<i>gyrB</i>	Forward	TGGTGGAAAGTGGTCATATTT	76	This study
	Reverse	TGCTCTTGGCTTACCCTTTTTG		
<i>adeB</i>	Forward	CGAGTGGCACAACTAGCATC	61	This study
	Reverse	CCTTGTCTTGGCTGCACTCT		
<i>adeJ</i>	Forward	CCTATTGCACAATATCCAACGA	119	This study
	Reverse	AGGATAAGTCGAGCAATCG		
<i>adeG</i>	Forward	GTCCTGAAATGGTCGTTCTG	43	This study
	Reverse	AGCTTCTGCTTGGCTAGATGA		
<i>craA</i>	Forward	TTCAATTGCTTGGCCTTT	125	This study
	Reverse	CCAGTGCCATGAAACATAATCA		
<i>abeM</i>	Forward	AGGGACGTATTATGGCGAAA	165	This study
	Reverse	CTGCTGTGCTTAGACCAATTTT		
<i>amvA</i>	Forward	GCAGAGAAATTTTGCACTTGG	10	This study
	Reverse	CGACTAATGGACCAAAAGCTG		
<i>ompA</i>	Forward	GGTATTCAGATAATTTTTCAGCAACTT	129	This study
	Reverse	AACAAATCAAACATCAAAGACCAA		
<i>ompW</i>	Forward	GCCTTATTGCTCTGCCAAC	60	This study
	Reverse	CGTTTGAAACCATCACCATTCT		
<i>dcap-like</i>	Forward	TGATCGACTTCTCGACAAACA	77	This study
	Reverse	GTGTAGTTGGGCCTAGTTTGTAGTT		
<i>oprC</i>	Forward	ACTCGATACAAAGCGGTGGA	9	This study
	Reverse	TTTAATACGTGAACCAACATACCTC		
<i>oprB</i>	Forward	GCCCCACACTTCTTGAACAG	67	This study
	Reverse	ATGGGCAATCGCTTTCTG		
<i>omp25</i>	Forward	CGAACGTGAAATCGACAACA	128	This study
	Reverse	CGTAACCTTTAACACCTAGAGCAAG		
<i>omp33-omp36</i>	Forward	CAAGTGTGCTAACCAATTCGCT	FAM-CCAACTGCTGCTATCCAAA	This study
	Reverse	GTTTTCTTGACCGAATGCACC	CGACCAA-BBQ	
<i>carO</i>	Forward	TGTTTCATGACAGCTATGCATTCGATA	FAM-CGCTCGTGTGAAGTAGGTAC	This study
	Reverse	CCCAATGCTAAACCTACATATGGGT	TACAGGTT-BBQ	
Sequencing analysis				
<i>adeR</i>	Forward	ACTACGATATTGGCGACATT		13–15
	Reverse	GCGTCAGATTAAGCAAGATT		
<i>adeS</i>	Forward	TTGGTTAGCCACTGTTATCT		13–15
	Reverse	AGTGGACGTTAGGTCAAGTT		
<i>adeN</i>	Forward	GCTGTTAGGTTGGGGTCGTA		18
	Reverse	CGTGACCAAAAAGTACGAATCA		

<sup>a</sup> FAM, 6-carboxyfluorescein; BBQ, BlackBerry Quencher.

We detected *tet* genes in both clones: the *tetB* gene in all strains of PFGE-ROC-1 and the *tetA*(39) gene in strains of the PFGE-HUI-1 clone (except for strains 421, 422, 423, 424, and 426).

In both *A. baumannii* clones, we detected the AacC1/AphA1/AadB combination of acetylases in strains displaying some resistance to aminoglycosides. We also detected mutations in the *gyrA* (Ser<sub>83</sub> → Leu) and *parC* (Ser<sub>80</sub> → Leu) genes in strains showing resistance to quinolones.

**Relative gene expression.** The levels of expression of the efflux pump genes in the isolates relative to that by *A. baumannii* ATCC 17978 (relative expression ([RE] values) are shown in Tables 2 to 4. For clone PFGE-ROC-1, we applied statistical analysis to genes with RE values higher than 8 (i.e., genes *adeB* and *adeJ*) to determine how gene expression was related to the antibiotic MICs (for strains carrying the OXA-58 β-lactamase gene, see Fig. 3; for strains carrying the OXA-24 β-lactamase gene, see Fig. 4). However, we were not able to analyze the *adeB* gene in strains of clone

PFGE-HUI-1, because the internal and external primers used did not amplify the genes in the AdeABC operon of these strains. Moreover, the relative expression of *adeJ* in this clone was not higher than 2.

The RE values of *adeG*, *craA*, *abeM*, and *amvA* in all strains ranged from 0.003 to 1.

Porin expression was not significantly related to antibiotic resistance in strains of clone PFGE-ROC-1 or PFGE-HUI-1. However, in strains of clone PFGE-ROC-1<sub>OXA-24</sub>, the RE values of the *carO* and *omp25* genes were lower than those in strains of clone PFGE-ROC-1<sub>OXA-58</sub> (Fig. 5). However, the RE values of the OXA-51 and *ampC* β-lactamase genes were similar among the isolates.

**Polymorphisms of the regulatory genes of the AdeABC and AdeIJK efflux pumps.** Strains of the PFGE-ROC-1 clone that overexpressed the AdeABC efflux pump had three mutations in the *adeS* gene (Ala<sub>94</sub> → Val, Gly<sub>186</sub> → Val, and Phe<sub>214</sub> → Leu) and

Rumbo et al.

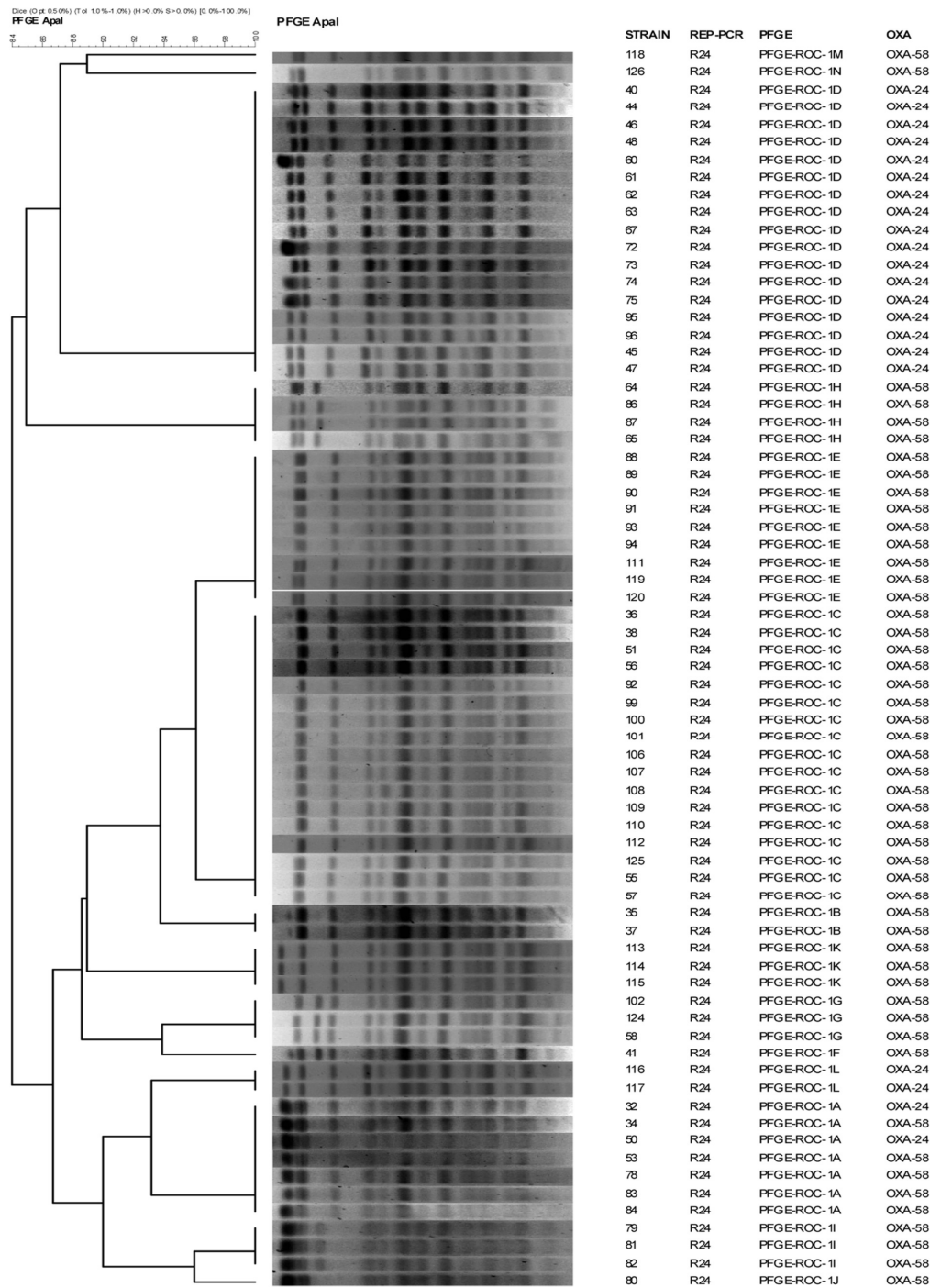


FIG 1 Pulsed-field electrophoresis of strains of the PFGE-ROC-1 clone. REP-PCR, repetitive element palindromic PCR.



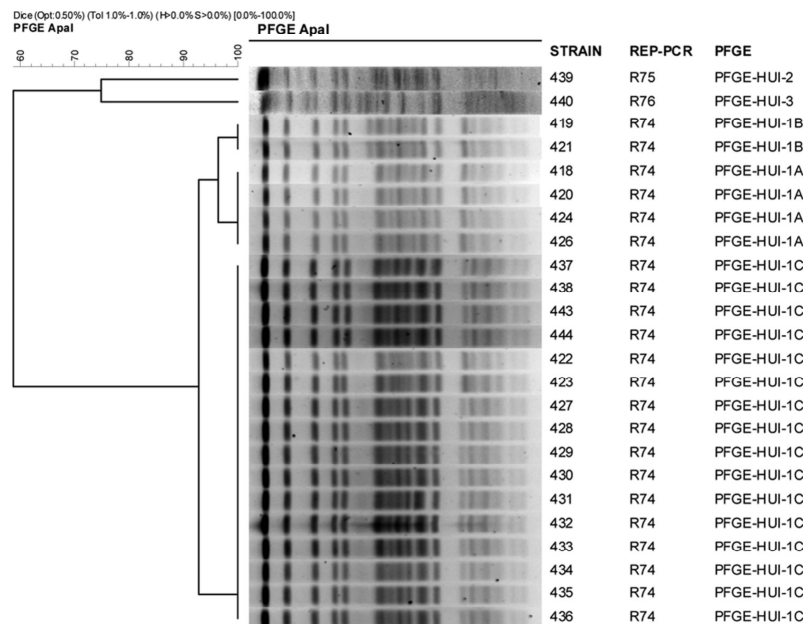


FIG 2 Pulsed-field electrophoresis of strains of the PFGE-HUI-1 clone.

one mutation in the *adeR* gene (Ala<sub>136</sub> → Val). Only two strains of this clone had mutations in the *adeN* regulatory gene in the AdeIJK efflux pump (His<sub>111</sub> → Pro, Ile<sub>112</sub> → Phe). The *adeS* and *adeR* genes in strains of clone PFGE-HUI-1 were not successfully amplified. In all strains of this clone, the *adeN* gene had one mutation (Pro<sub>16</sub> → Lys).

**Relation between relative gene expression and MICs.** Possible interactions between the mechanisms of resistance of the clinical strains of the two clones are summarized in Table 5.

**(i) Carbapenems.** For the carbapenems (imipenem, meropenem, and doripenem), resistance was associated with the presence of the OXA-type enzymes (OXA-24 and OXA-58 β-lactamases) in strains of clone PFGE-ROC-1.

**(ii) Aminoglycosides.** In gentamicin-resistant strains (MICs > 8 mg/liter) of clone PFGE-ROC-1, the AdeABC system was overexpressed and/or acetylases (AacC1/AphA1/AadB) were present. Moreover, in strains of both clones (PFGE-ROC-1 and PFGE-HUI-1), the presence of acetylases (AacC1/AphA1/AadB) was associated with resistance to netilmicin (MICs > 16 mg/liter), tobramycin (MICs > 8 mg/liter), and amikacin (MICs > 16 mg/liter).

**(iii) Glycylcyclines.** Resistance to tigecycline (MICs > 0.5 mg/liter) was associated with overexpression of the RND systems (AdeIJK efflux pump in PFGE-ROC-1<sub>OXA-58</sub> [Fig. 3] and AdeABC efflux pump in PFGE-ROC-1<sub>OXA-24</sub> [Fig. 4]) and the TetA(39) efflux pump. The presence of PAbetaN (an inhibitor of the RND system) in strains of clone PFGE-HUI-1 was associated with decreased resistance to tigecycline. In the strains of this clone with no TetA efflux pump (strains 421, 422, 423, 424, and 426), the tigecycline MIC decreased from 1 to ≤0.25 mg/liter (with PAbetaN). In those strains of clone PFGE-HUI-1 with a TetA system,

the tigecycline MIC decreased from 2 to 1 mg/liter in the presence of PAbetaN. The AdeIJK and AdeABC efflux pumps (in strains of clone PFGE-ROC-1) were associated with resistance to minocycline (MICs > 2 mg/liter). However, PFGE-ROC<sub>OXA-58</sub> displayed resistance to this antibiotic, possibly because of overexpression of the AdeIJK and TetB efflux pumps.

**(iv) Tetracyclines.** Resistance to tetracyclines was associated with TetB and TetA(39) efflux pumps. In doxycycline-resistant isolates (strains of PFGE-ROC-1<sub>OXA-58</sub> with MICs of >16 mg/liter), AdeIJK was overexpressed together with Tet systems.

**(v) Quinolones.** Finally, mutations of the *gyrA* and *parC* genes conferred resistance to ciprofloxacin without any variations in MICs.

## DISCUSSION

The impact of the interplay between different mechanisms of antimicrobial resistance in the susceptibility or resistance to antibiotics has been addressed in previous studies. Here, we focused on two of these studies in relation to the present study. One of these studies involved clinical strains of *P. aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients (representative of the Liverpool epidemic strain) (39), and the other involved strains isolated from bloodstream infections (40). In the present study, we attempted to determine if similar conclusions can be applied to clinical strains of *A. baumannii* in which resistance is associated with a multifactorial mechanism. We analyzed strains of two different clones, PFGE-ROC-1 and PFGE-HUI-1. The PFGE-ROC-1 clone included 53 strains carrying the OXA-58 β-lactamase gene (PFGE-ROC-1<sub>OXA-58</sub>) and 18 strains carrying the OXA-24 carbapenemase gene (PFGE-ROC-1<sub>OXA-24</sub>). The enzymes encoded by both of these genes are highly prevalent in isolates of *A. baumannii* in

TABLE 2 MICs and RE of genes harboring efflux pumps<sup>c</sup>

Strain <sup>a</sup>	MIC <sup>d</sup> (mg/liter)										RE <sup>b</sup>					
	TIG	GEN	AMK	DOX	MIN	NET	TET	RIF	TOB	DOR	<i>adeB</i>	<i>adeJ</i>	<i>adeG</i>	<i>craA</i>	<i>abeM</i>	<i>amvA</i>
65	≤0.25	8	<2	16	2	1	>64	2	1	4	1.13	<b>3.10</b>	1.00	0.43	0.21	0.002
34	0.5	2	32	32	2	>64	>64	64	32	8	<b>27.73</b>	0.55	0.70	1.31	0.60	0.003
35	0.5	4	16	32	2	>64	>64	64	64	8	<b>31.97</b>	0.40	0.82	1.12	0.66	0.003
37	0.5	4	16	32	2	>64	>64	64	32	8	<b>28.10</b>	0.42	0.70	1.25	0.78	0.003
41	0.5	4	32	16	2	>64	>64	64	64	4	<b>26.89</b>	0.57	0.66	1.34	0.50	0.003
51	0.5	4	16	32	4	>64	>64	64	64	8	<b>16.21</b>	1.62	0.41	0.65	0.70	0.004
53	0.5	4	16	32	4	>64	>64	64	32	8	<b>17.03</b>	1.06	0.49	0.70	0.48	0.003
55	0.5	4	16	32	4	>64	>64	64	64	8	<b>18.25</b>	1.38	0.85	0.64	0.37	0.004
57	0.5	4	16	32	4	>64	>64	64	64	8	<b>10.43</b>	<b>4.69</b>	0.37	0.70	0.78	0.003
78	0.5	32	<2	16	2	4	>64	64	<0.5	4	<b>23.88</b>	<b>5.44</b>	0.96	1.14	0.40	0.007
88	0.5	4	32	16	2	>64	>64	32	32	4	<b>11.77</b>	<b>6.60</b>	0.92	0.73	0.24	0.003
118	0.5	32	16	32	2	>64	>64	32	64	4	<b>35.08</b>	0.61	1.31	0.64	0.27	0.003
126	0.5	16	<2	2	4	4	>64	32	<0.5	4	1.77	1.06	1.27	0.64	0.32	0.004
36	1	4	16	32	2	>64	>64	64	64	4	<b>32.25</b>	0.61	0.80	1.03	0.69	0.004
38	1	4	32	32	2	>64	>64	64	64	8	<b>30.51</b>	1.34	0.78	1.14	0.51	0.002
58	1	4	32	32	4	>64	>64	64	64	8	<b>26.93</b>	<b>2.20</b>	0.44	0.85	0.45	0.005
83	1	2	32	32	4	>64	>64	64	32	4	<b>33.76</b>	<b>7.98</b>	1.37	0.80	0.19	0.002
84	1	2	32	32	4	>64	>64	64	64	4	<b>13.45</b>	<b>10.02</b>	1.08	0.85	0.24	0.003
86	1	64	8	32	4	32	>64	2	2	4	<b>22.39</b>	<b>6.85</b>	0.97	0.69	0.19	0.004
87	1	64	4	64	4	16	>64	2	2	4	<b>43.48</b>	<b>6.82</b>	0.92	0.67	0.08	0.003
89	1	>64	4	64	4	32	>64	64	64	4	7.25	<b>5.61</b>	1.17	0.89	0.21	0.003
90	1	2	16	64	4	>64	>64	64	32	8	<b>20.86</b>	<b>10.33</b>	1.00	0.72	0.23	0.004
110	1	2	16	16	4	>64	>64	32	64	4	<b>30.22</b>	<b>5.18</b>	1.25	0.31	0.30	0.003
111	1	2	16	16	2	>64	>64	32	32	4	<b>9.86</b>	<b>5.39</b>	1.55	0.31	0.21	0.003
112	1	2	8	16	2	>64	>64	32	32	8	<b>11.45</b>	<b>3.06</b>	1.23	0.21	0.18	0.36
113	1	2	<2	32	2	4	>64	32	<0.5	4	<b>24.40</b>	<b>4.27</b>	0.89	0.31	0.25	0.006
114	1	1	<2	32	2	4	>64	32	1	4	<b>7.01</b>	<b>3.87</b>	0.77	0.27	0.26	0.004
115	1	1	<2	16	2	4	>64	16	<0.5	4	<b>30.32</b>	<b>3.13</b>	0.82	0.75	0.19	0.003
119	1	32	16	32	2	>64	>64	32	32	4	<b>43.01</b>	0.60	1.23	0.54	0.33	0.003
120	1	32	16	16	2	>64	>64	32	32	4	<b>35.43</b>	0.66	0.75	0.65	0.19	0.003
124	1	4	64	64	4	>64	>64	32	64	4	<b>46.58</b>	0.72	0.79	0.63	0.30	0.004
125	1	4	16	32	8	>64	>64	64	32	4	<b>32.77</b>	<b>8.97</b>	0.45	0.70	0.30	0.005
56	2	2	<2	32	4	8	>64	64	1	8	<b>21.05</b>	<b>5.82</b>	0.48	0.87	0.38	0.003
64	2	64	4	32	2	16	>64	2	4	4	<b>68.98</b>	<b>2.94</b>	0.36	0.62	0.21	0.004
79	2	>64	4	16	1	16	>64	2	2	8	<b>37.66</b>	<b>12.58</b>	1.57	0.59	0.22	0.004
80	2	>64	8	32	4	32	>64	1	2	8	<b>32.70</b>	<b>10.77</b>	0.97	0.63	0.19	0.002
81	2	64	4	32	4	16	>64	2	2	4	<b>46.54</b>	<b>11.16</b>	0.92	0.86	0.18	0.002
82	2	64	<2	32	2	16	>64	1	1	4	<b>27.63</b>	<b>10.04</b>	1.00	0.97	0.15	0.002
101	2	2	16	32	4	>64	>64	32	32	4	<b>12.44</b>	<b>4.13</b>	1.25	0.24	0.13	0.003
102	2	2	16	32	4	>64	>64	32	32	4	<b>8.91</b>	<b>7.26</b>	1.17	0.36	0.28	0.005
106	2	2	8	64	8	>64	>64	64	32	4	<b>12.06</b>	<b>10.55</b>	1.38	0.76	0.31	0.006
107	2	2	32	64	8	>64	>64	64	32	4	<b>16.38</b>	<b>10.80</b>	0.91	0.25	0.32	0.004
108	2	4	32	64	8	>64	>64	64	32	8	<b>23.92</b>	<b>10.94</b>	1.07	0.21	0.29	0.002
109	2	4	32	64	8	>64	>64	64	32	8	<b>23.37</b>	<b>6.32</b>	0.68	0.32	0.22	0.003

<sup>a</sup> Strains are ranked according to the MIC of tigecycline.<sup>b</sup> Increased gene RE values of ≥2 are indicated in bold.<sup>c</sup> The reference strain used was *A. baumannii* ATCC 17978. RNA (50 µg/ml) was from strains of the PFGE-ROC-1<sub>OXA58</sub> clone.<sup>d</sup> TIG, tigecycline; GEN, gentamicin; AMK, amikacin; DOX, doxycycline; MIN, minocycline; NET, netilmicin; TET, tetracycline; RIF, rifampin; TOB, tobramycin; DOR, doripenem.

the Iberian Peninsula (41, 42). Only strains of the PFGE-HUI-1 clone ( $n = 19$  strains) have previously shown susceptibility to carbapenems (23).

Overexpression of the AdeABC system (RE, 30- to 45-fold) was significantly associated with resistance to gentamicin (MICs > 8 mg/liter) in strains of PFGE-ROC-1 (which produce the OXA-58 and OXA-24  $\beta$ -lactamases) (8). Moreover, in strains of PFGE-ROC-1<sub>OXA-24</sub>, resistance to tigecycline (MICs > 0.5 mg/liter) and minocycline (MICs > 2 mg/liter) was also significantly associated

with expression of this efflux pump, as previously reported (8). All strains of the PFGE-ROC-1 clone had mutations in the *adeR* (Ala<sub>136</sub> → Val) and *adeS* (Ala<sub>94</sub> → Val, Gly<sub>186</sub> → Val, and Phe<sub>214</sub> → Leu) genes. Hornsey et al. associated the Ala<sub>94</sub> → Val substitution with overexpression of the AdeABC efflux pump in *A. baumannii* strains representative of the prevalent United Kingdom lineage, OXA-23 clone 1 (16, 43). However, the other mutations have not previously been described. Peleg et al. (17) reported that increased (40- to 54-fold) expression of the *adeB* gene was

TABLE 3 MICs and RE of genes harboring efflux pumps<sup>c</sup>

Strain <sup>a</sup>	MIC <sup>d</sup> (mg/liter)										RE <sup>b</sup>					
	TIG	GEN	AMK	DOX	MIN	TET	NET	RIF	TOB	DOR	<i>adeB</i> <sup>b</sup>	<i>adeJ</i>	<i>adeG</i>	<i>craA</i>	<i>abeM</i>	<i>amvA</i>
44	≤0.25	2	32	16	1	>64	>64	2	32	64	<b>26.60</b>	1.69	0.68	1.47	0.39	0.002
45	≤0.25	2	32	16	1	>64	>64	1	64	>64	<b>15.00</b>	1.21	0.67	0.71	0.43	0.001
47	≤0.25	4	16	16	1	>64	>64	1	64	64	<b>19.50</b>	1.29	0.80	0.53	0.45	0.002
61	≤0.25	4	16	16	4	>64	>64	2	64	64	<b>23.25</b>	1.24	0.34	0.99	0.15	0.005
62	≤0.25	2	32	16	1	>64	>64	1	64	>64	<b>20.19</b>	1.67	0.49	0.49	0.17	0.002
95	≤0.25	4	32	16	1	>64	>64	<0.5	32	>64	<b>33.95</b>	1.33	1.06	0.32	0.22	0.002
40	0.5	4	32	16	1	>64	>64	1	64	64	<b>12.88</b>	0.25	0.59	0.91	0.36	0.001
46	0.5	2	32	16	1	>64	>64	1	64	>64	<b>10.82</b>	1.70	0.84	1.18	0.38	0.002
48	0.5	8	32	16	1	>64	>64	1	64	64	<b>10.28</b>	1.13	1.04	0.81	0.33	0.002
50	0.5	2	64	16	<0.5	>64	>64	2	64	64	<b>11.91</b>	1.25	0.44	0.70	0.41	0.002
60	0.5	4	64	16	1	>64	>64	1	64	64	<b>29.20</b>	1.52	0.36	1.18	0.41	0.003
72	0.5	2	32	16	<0.5	>64	>64	1	32	>64	<b>24.94</b>	1.19	0.87	0.73	0.23	0.004
73	0.5	2	32	16	<0.5	>64	>64	2	64	>64	<b>7.53</b>	1.21	0.60	0.72	0.17	0.004
74	0.5	>64	<2	32	4	>64	64	4	4	>64	<b>22.19</b>	1.08	0.51	0.68	0.17	0.003
75	0.5	>64	4	16	4	>64	64	4	4	>64	<b>13.95</b>	0.84	0.49	0.52	0.17	0.002
96	0.5	4	32	16	1	>64	>64	1	64	64	<b>8.55</b>	1.46	0.97	0.31	0.22	0.002
63	1	4	16	16	1	>64	>64	1	32	64	<b>43.11</b>	1.87	0.41	0.59	0.23	0.005
67	1	64	32	16	<0.5	>64	>64	1	64	>64	<b>44.95</b>	0.81	0.63	0.45	0.19	0.002

<sup>a</sup> Strains are ranked according to the MIC of tigecycline.<sup>b</sup> Increased gene RE values of ≥2 are indicated in bold.<sup>c</sup> The reference strain used was *A. baumannii* ATCC 17978. RNA (50 µg/ml) was from strains of the PFGE-ROC-1<sub>OXA24</sub> clone.<sup>d</sup> TIG, tigecycline; GEN, gentamicin; AMK, amikacin; DOX, doxycycline; MIN, minocycline; TET, tetracycline; NET, netilmicin; RIF, rifampin; TOB, tobramycin; DOR, doripenem.

associated with tigecycline MICs of 4 to 16 mg/liter in *A. baumannii*. We found that tigecycline-susceptible strains (MIC = 0.5 mg/liter) were associated with increased expression of the *adeB* gene (about 20- to 30-fold), which could indicate the role of the AdeABC efflux pump in others functions necessary for the pathogenesis of clinical strains of *A. baumannii*, such as colonization, infection, and the persistence of microorganisms in the host (10).

We did not detect the AdeABC efflux pump or regulator genes in clinical strains of *A. baumannii* clone PFGE-HUI-1 (susceptible to carbapenems). As mentioned above, this efflux pump is present in 80% (range, 53% to 97%) of clinical isolates studied so far (8).

Increased expression of the AdeIJK efflux pump (RE, 8- to 10-fold) was significantly associated with tigecycline resistance (MICs > 0.5 mg/liter) and minocycline resistance (MICs > 2

TABLE 4 MICs and RE of efflux pumps<sup>c</sup>

Strain <sup>a</sup>	MIC <sup>d</sup> (mg/liter)										RE <sup>b</sup>					
	TIG	GEN	AMK	DOX	MIN	TET	NET	RIF	TOB	DOR	<i>adeB</i>	<i>adeJ</i>	<i>adeG</i>	<i>craA</i>	<i>abeM</i>	<i>amvA</i>
421	1	>64	64	<0.5	<0.5	4	64	2	64	1	NA	1.44	1.23	1.20	0.04	0.01
422	1	16	16	<0.5	<0.5	8	8	2	8	<0.5	NA	1.37	2.11	0.82	0.05	0.02
423	1	16	16	<0.5	<0.5	8	8	2	16	1	NA	1.21	1.16	0.63	0.07	0.02
424	1	16	64	1	1	4	8	16	32	<0.5	NA	1.41	0.89	0.68	0.04	0.02
426	1	64	32	1	1	8	64	16	32	<0.5	NA	1.69	1.00	0.45	0.04	0.02
427	2	16	16	8	<0.5	>64	8	4	8	1	NA	1.46	0.83	0.42	0.04	0.02
428	2	16	16	4	<0.5	>64	4	2	8	1	NA	1.64	0.89	0.49	0.05	0.02
429	2	64	4	4	<0.5	>64	8	4	8	1	NA	1.75	0.91	0.48	0.04	0.01
430	2	32	16	8	<0.5	>64	16	4	16	1	NA	1.22	0.76	0.48	0.04	0.02
431	2	64	4	8	1	>64	32	32	32	1	NA	1.28	1.00	0.44	0.04	0.02
432	2	16	16	4	<0.5	>64	4	4	16	2	NA	1.61	0.90	0.53	0.04	0.02
433	2	16	16	8	<0.5	>64	8	4	16	2	NA	1.51	0.89	0.54	0.04	0.02
434	2	16	16	4	<0.5	>64	8	4	8	2	NA	1.82	1.09	0.50	0.04	0.02
435	2	32	32	4	<0.5	>64	8	2	32	1	NA	1.27	0.90	0.34	0.05	0.01
436	2	16	16	8	1	>64	16	4	8	1	NA	1.32	0.79	0.43	0.04	0.01
437	2	16	16	4	1	>64	4	4	16	<0.5	NA	0.72	1.18	0.78	0.03	0.03
438	2	32	16	8	1	>64	8	4	16	<0.5	NA	1.25	1.51	0.60	0.03	0.02
443	2	16	16	4	<0.5	>64	8	4	8	1	NA	0.91	0.80	0.52	0.04	0.01

<sup>a</sup> Strains are ranked according to the MIC of tigecycline.<sup>b</sup> Primers for *adeA* and *adeC* genes were also used. NA, not applicable.<sup>c</sup> The reference strain used was *A. baumannii* ATCC 17978. RNA (50 µg/ml) was from strains of the PFGE-HUI-1 clone (susceptible to carbapenems).<sup>d</sup> TIG, tigecycline; GEN, gentamicin; AMK, amikacin; DOX, doxycycline; MIN, minocycline; TET, tetracycline; NET, netilmicin; RIF, rifampin; TOB, tobramycin; DOR, doripenem.

Rumbo et al.

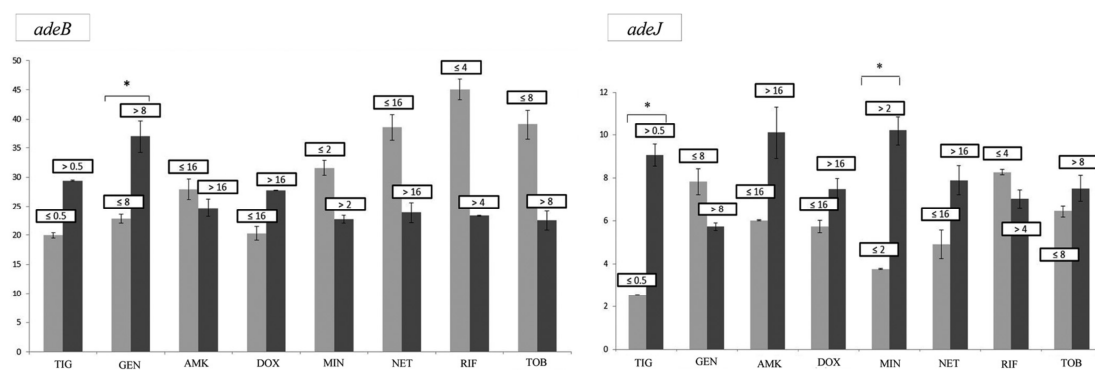


FIG 3 Relative expression of the *adeB* and *adeJ* genes from strains of the PFGE-ROC-1<sub>OXA-58</sub> clone in relation to the MICs of different antibiotics. \*,  $P < 0.05$  (Student's *t* test). Light gray bars, strains susceptible to several antibiotics (grouped by MIC [in mg/liter]); dark gray bars, strains resistant to several antibiotics (grouped by MIC [in mg/liter]); TIG, tigecycline; GEN, gentamicin; AMK, amikacin; DOX, doxycycline; MIN, minocycline; NET, netilmicin; RIF, rifampin; TOB, tobramycin.

mg/liter) in strains of PFGE-ROC-1<sub>OXA-58</sub>. However, this system was not significantly associated with resistance to netilmicin or tobramycin (aminoglycosides). These results are consistent with those obtained by Coyne et al. (44). These authors also noted that overexpression of this pump is always lower than that of the AdeABC system. These results could confirm the theory that high-level expression of the AdeIJK efflux pump is toxic to the host cell (45). The *adeJ* gene was not overexpressed in strains of the PFGE-ROC-1<sub>OXA-24</sub> and PFGE-HUI-1 clones. Only two strains of the PFGE-ROC-1<sub>OXA-58</sub> clone had two new mutations in a gene regulating the AdeIJK pump (*adeN*; His<sub>111</sub> → Pro, Ile<sub>112</sub> → Phe), and all strains of PFGE-HUI-1 had a Pro<sub>16</sub> → Lys substitution in the *adeN* gene. None of these mutations have been associated with

overexpression of AdeIJK, although other possible mechanisms of regulation cannot be ruled out (18).

Expression of *adeG* (AdeFGH), *craA*, *abeM*, and *amvA* was not increased (RE, 0.003 to 1) in strains of the PFGE-ROC-1 or PFGE-HUI-1 clone.

Gram-positive bacteria are the origin of *tet* genes detected in Gram-negative bacteria, such as *A. baumannii* (22, 38). Here, we detected the *tetB* gene in strains of the PFGE-ROC-1 clone, all of which were resistant to tetracycline (MICs = 16 to 64 mg/liter) and doxycycline (MICs = 16 to 64 mg/liter). Moreover, in some strains (PFGE-ROC-1<sub>OXA-58</sub>), overexpression of AdeIJK together with the presence of this acquired efflux pump was possibly associated with resistance to minocycline (MICs = 2 to 4 mg/liter). In

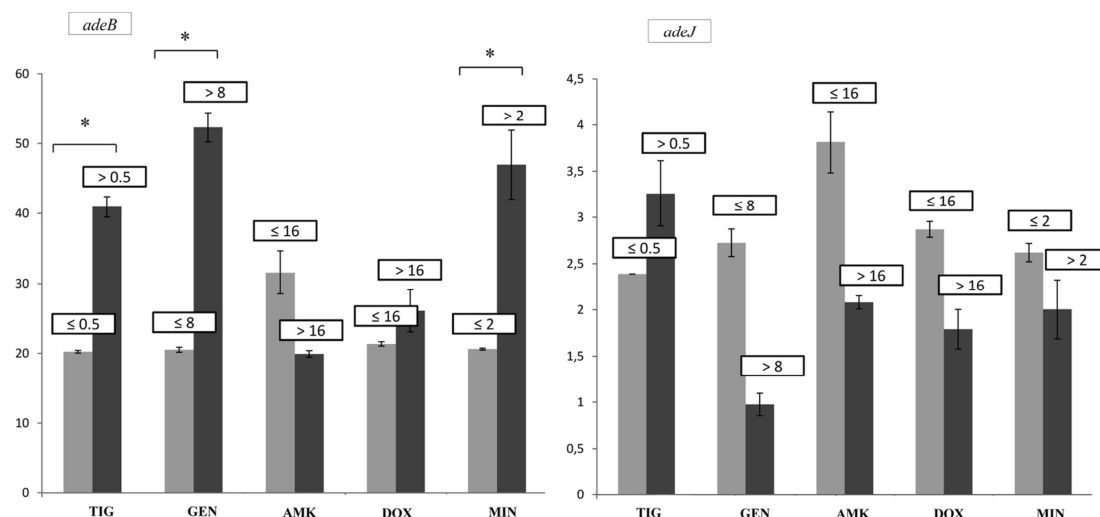


FIG 4 Relative expression of the *adeB* and *adeJ* genes from strains of the PFGE-ROC-1<sub>OXA-24</sub> clone in relation to the MICs of different antibiotics. \*,  $P < 0.05$  (Student's *t* test). Light gray bars, strains susceptible to several antibiotics (grouped by MIC [in mg/liter]); dark gray bars, strains resistant to several antibiotics (grouped by MIC [in mg/liter]); TIG, tigecycline; GEN, gentamicin; AMK, amikacin; DOX, doxycycline; MIN, minocycline.



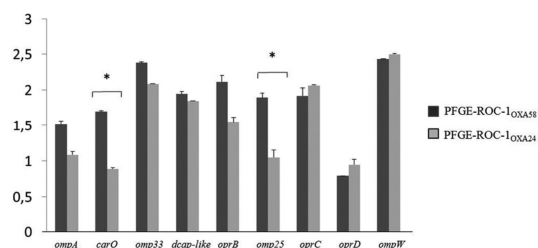


FIG 5 Relative expression of porin genes by strains of the PFGE-ROC-1<sub>OXA-58</sub> and PFGE-ROC-1<sub>OXA-24</sub> clones. \*,  $P < 0.05$  (Student's  $t$  test).

other pathogens, such as *Escherichia coli*, the combination of AcrAB-TolC and TetA has been associated with a high degree of resistance to tetracycline (46). Our results showed that detection of the *tetA*(39) gene in all strains of this clone was associated with resistance to tetracycline and doxycycline. Agersø and Guardabassi (47) analyzed the presence of this gene in *A. baumannii* strains. These authors located the gene in both environmental and clinical strains, and they found the *tetA*(39) gene in 33 tigecycline-resistant strains (MICs  $\geq 16$  mg/liter). We noted that in strains of PFGE-HUI-1 harboring the *tetA*(39) gene, the tigecycline MIC was lower (2 to 1 mg/liter) in the presence of PABetaN (an RND efflux pump inhibitor), and the MIC decreased from 1 to 0.25 mg/liter in the *A. baumannii* strains without this gene. This suggests the involvement of a new RND efflux pump, together with the TetA(39) system, in the resistance to tigecycline.

In relation to porins and unlike in other pathogens, such as *Pseudomonas aeruginosa*, in which OprD expression plays an important role in resistance to carbapenem antibiotics (39), we found that decreased expression of a porin was significantly associated with antimicrobial resistance. We observed decreased RE only of the *carO* and *omp25* genes, on comparing strains of PFGE clone-ROC-1<sub>OXA-58</sub> and PFGE clone-ROC-1<sub>OXA-24</sub>. This decrease was not associated with resistance to carbapenems, which is known to be associated with the presence of the  $\beta$ -lactamases (9). Moreover, the carbapenem resistance was not associated with expression of the OXA-51 and AmpC chromosomal  $\beta$ -lactamases.

Overall, our data revealed that the presence of OXA-type enzymes (OXA-24 and/or OXA-58) is sufficient to confer resistance to carbapenem in the *A. baumannii* strains under study, as previously found (41, 42). Moreover, resistance to doripenem was also associated with the presence of the  $\beta$ -lactamases OXA-58 (MICs = 4 to 8 mg/liter) and OXA-24 (MICs = 64 to  $>64$  mg/liter) (compared with MICs for strains of the PFGE-HUI-1 clone of 0.5 to 1 mg/liter). Marti and colleagues (48) analyzed the activity of doripenem against clinical isolates of *A. baumannii* and concluded that doripenem was more active than imipenem and meropenem in strains carrying the OXA-58  $\beta$ -lactamase gene. However, in the present study, doripenem, imipenem, and meropenem MICs were high for the clinical strains producing the OXA-24 enzyme.

Quinolone resistance did not vary between the strains under study and was associated with previously reported mutations in *gyrA* and *parC* (7). Aminoglycoside-resistant isolates of clones PFGE-ROC-1 and PFGE-HUI-1 showed acetylases known to be common in *A. baumannii* strains (AacC1, AphA1, and AadB) (49).

In conclusion, (i) the clinical strains of *Acinetobacter baumannii* under study possess efflux systems and other mechanisms (possibly connected) that enable them to develop resistance to various antimicrobials and that also have other functions necessary in bacterial pathogenesis. (ii) Overexpression of the AdeABC system was found to be associated with resistance to glycylicycline (tigecycline and minocycline) and aminoglycosides (gentamicin), and possibly other biological functions, in the clinical strains under study. (iii) Hyperexpression of the AdeIJK efflux pump was significantly associated with resistance to tigecycline and minocycline but did not appear to be involved in other functions related to the pathogenesis of the bacterium. This efflux pump may be related to the TetB system and, thus, to minocycline resistance. (iv) Porins, AmpC  $\beta$ -lactamases, and OXA-51 were not involved in the antimicrobial resistance observed in the present study in the presence of OXA-type enzymes (OXA-24 and OXA-58). (v) The OXA-24 and OXA-58  $\beta$ -lactamases were associated with resistance to meropenem, doripenem, and imipenem (especially the OXA-24  $\beta$ -lactamase). (vi) The presence of the Tet efflux pumps in *A. baumannii* isolates was associated with resistance to tetracyclines and doxycycline. (vii) Finally, a new RND efflux pump may

TABLE 5 Interplay of mechanisms of resistance to several antibiotics of the strains of clones PFGE-ROC-1 and PFGE-HUI-1 under study

Antibiotic(s)	Mechanism of resistance		
	PFGE-ROC-1 <sub>OXA-58</sub>	PFGE-ROC-1 <sub>OXA-24</sub>	PFGE-HUI-1
Tigecycline	Overexpression of AdeIJK	Overexpression of AdeABC	New RND efflux system/TetA(39) efflux pump <sup>c</sup>
Gentamicin	Overexpression of AdeABC/acetylases ( <i>aacC1</i> , <i>aphA1</i> , <i>aadB</i> )	Overexpression of AdeABC/acetylases ( <i>aacC1</i> , <i>aphA1</i> , <i>aadB</i> )	Acetylases ( <i>aacC1</i> , <i>aphA1</i> , <i>aadB</i> )
Minocycline	Overexpression of AdeIJK/TetB efflux pumps	Overexpression of AdeABC <sup>b</sup>	
Netilmicin, tobramycin, and amikacin	Acetylases ( <i>aacC1</i> , <i>aphA1</i> , <i>aadB</i> )	Acetylases ( <i>aacC1</i> , <i>aphA1</i> , <i>aadB</i> )	Acetylases ( <i>aacC1</i> , <i>aphA1</i> , <i>aadB</i> )
Imipenem, meropenem, and doripenem	OXA-58 $\beta$ -lactamase	OXA-24 $\beta$ -lactamase	
Ciprofloxacin	Mutations in <i>gyrA</i> and <i>parC</i>	Mutations in <i>gyrA</i> and <i>parC</i>	Mutations in <i>gyrA</i> and <i>parC</i>
Doxycycline	Overexpression of AdeIJK <sup>a</sup> /TetB efflux pumps	TetB efflux pump	TetA(39) efflux pump <sup>c</sup>
Tetracyclines	TetB efflux pump	TetB efflux pump	TetA(39) efflux pump <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Nonsignificantly increased expression relative to strains with doxycycline resistance.

<sup>b</sup> Only three isolates, 61, 74, and 75.

<sup>c</sup> Except for strains 421, 422, 423, 424, and 426.

Rumbo et al.

act in combination with the TetA(39) system to confer resistance to tigecycline in the absence of the AdeABC efflux pump and over-expression of the other systems in *A. baumannii* clinical strains susceptible to carbapenems.

The main limitation of the study was that we were not able to study the complex mechanisms of resistance to carbapenems in strains that did not produce OXA-type enzymes.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Neil Woodford for supplying strains AB210 and AB211 and Juan Vallejo for the elaboration of the figures.

Research in our laboratories is financially supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III, the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD 06/0008/0025), the Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI08/1368 and PS09/00687 to G.B. and PI10/00056 to M.T.), SERGAS (PS07/90), and the Xunta de Galicia (07CSA050916PR). C.R. is funded by a doctoral grant (PFIS) from the Instituto de Salud Carlos III, and M.T. is supported by the Instituto de Salud Carlos III (program Miguel Servet), both from the Ministerio de Economía y Competitividad.

We are grateful to the following organizations and researchers who participated in the study: Hospital Virgen del Rocío (José Garnacho, Antonio Gutierrez Pizarra, Juan Antonio Márquez Vácaro), Hospital Marqués de Valdecilla (María Eliecer Cano, M. Carmen Fariñas), Hospital SAS la Línea (Antonio Sánchez Porto, Gloria Esteban Meruendano, Luis Barbeyto Vales, Javier Casas Ciria, Luis Vallejo), Complejo Hospitalario de Ourense (Begona Fernández Pérez, José Carlos Villar Chao), Hospital Gregorio Marañón (Belén Padilla Ortega, Emilia Cercenado Mansilla), Hospital de Navarra (José Javier García Irure), Hospital Costa del Sol-Marbella (Alfonso del Arco Jiménez), Hospital General de Valencia (Concepción Gimeno Cardona, Juan Carlos Valia, Núria Tormo Palop, Vicente Abril, Josefina Rifa, María Jesus, Martínez García), Consorcio Hospitalari de Vic (Joseph Vilaró Pujals, Marian Navarro Aguirre, Ana Vilamala), Policlínica Guipúzcoa (José Antonio Jiménez Alfaro, Carlos Reviejo Jaca), Hospital Puerta del Mar (Pilar Marín Casanova, Francisca Guerreiro, Evelyn Shaw, Virginia Plasencia), Complejo Hospitalario de Soria (Teresa Nebreda Mayoral, María José Fernández Calavia, Susana García de Cruz, Carmen Aldea Mansilla), Hospital Universitario de Alicante (Esperanza Merino de Lucas, Alfredo Zorraquino, Sergio Reus Bañuls), Hospital Infanta Cristina (Eugenio Garduno Eseverri, Luis López Sánchez), Hospital Universitario Central de Asturias (Ana Fleites Gutiérrez, Azucena Rodríguez Guardado, Alfonso Moreno), Hospital Donostia (José María García-Arenzana Anguera), Complejo Hospitalario Torrecárdenas (Serafín López Palmero, Manuel Rodríguez Maresca), Complejo Hospitalario Xeral-Calde Lugo (Fernando García Garrote, José Varela Otero, María del Pilar Alonso), Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba (Elisa Vidal Verdú, Fernando Rodríguez López), Hospital Universitario Santiago Compostela (Fernanda Pardo Sánchez, E. Ferrer Vizoso, B. Regueiro García), Hospital Sant Pau (Mercé Gurgui, Roser Pericas, Virginia Pomar), Hospital Galdakao-Usansolo (Pedro María Olaechea Astigarraga, Rafael Ayarza Igartua), Hospital Son Dureta (María Dolores Maciá Romero, Enrique Ruiz de Gopegui Bordes), Hospital Puerta de Hierro (María Isabel Sánchez Romero), Hospital Juan Grande (Jesús García Mata, María José Goyanes, Cristina Morales Mateos), Hospital San Cecilio (José Hernández Quero, Trinidad Escobar Lara), Hospital Sant Joan de Reus (Frederic Ballester Bastardie, Simona Iftimie, Isabel Pujol Bajador), Hospital de Motril (María Isabel Galán Navarro, María Luz Cádiz Gurra), Hospital San Agustín (Carmen Amores Antequera, Montserrat Gómez, Purificación Cantudo), Hospital de Granollers (Carmena Martí Salas, Jordi Cuquet Peragosa, Antonio Moreno Flores, Luis Anibarro García), Hospital de Segovia (Susana Hernandez Real, Pablo A. Carrero González), Complejo Hospitalario de Pontevedra (María Angeles Pallarés González, Sergio Rodríguez Fernández), Hospital de Bellvitge (Miquel Pujol Rojo, Fe Tubau), Hospital Virgen de la Victoria de Málaga (Enrique Nuno Alvarez, María Ortega Torres), Hospital Doctor Moliner

(Salvador Giner Almaraz, María Rosa Roca Castelló, Manuela Castillo, Elena Hortelano), Hospital 12 de Octubre (Fernando Chaves Sánchez, Ana García Reyne), Hospital del Mar (Juan Pablo Horcajada Gallego, Concha Segura), Hospital San Agustín de Avilés (Gema Sierra Dorado, Raquel Yano Escudero), and Complejo Hospitalario Materno Insular de Gran Canaria (María Elena Dorta Hung, Cristóbal del Rosario Q).

#### REFERENCES

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 21:538–582.
2. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. 2007. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 51:3471–3484.
3. Bou G, Martínez-Beltrán J. 2000. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 44:428–432.
4. Brown S, Young HK, Amyes SG. 2005. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. Clin. Microbiol. Infect. 11:15–23.
5. del Mar Tomás M, Beceiro A, Pérez A, Velasco D, Moure R, Villanueva R, Martínez-Beltrán J, Bou G. 2005. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 49:5172–5175.
6. Limansky AS, Mussi MA, Viale AM. 2002. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. J. Clin. Microbiol. 40:4776–4778.
7. Hujer KM, Hujer AM, Endimiani A, Thomson JM, Adams MD, Goglin K, Rather PN, Pennella TT, Massire C, Eshoo MW, Sampath R, Blyn LB, Ecker DJ, Bonomo RA. 2009. Rapid determination of quinolone resistance in *Acinetobacter* spp. J. Clin. Microbiol. 47:1436–1442.
8. Coyne S, Courvalin P, Perichon B. 2011. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. Antimicrob. Agents Chemother. 55:947–953.
9. Poirel L, Nordmann P. 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin. Microbiol. Infect. 12:826–836.
10. Martínez JL, Sanchez MB, Martínez-Solano L, Hernandez A, Garmendia L, Fajardo A, Alvarez-Ortega C. 2009. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. FEMS Microbiol. Rev. 33:430–449.
11. Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Périchon B. 2010. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 54:4389–4393.
12. Huys G, Cnockaert M, Nemeš A, Swings J. 2005. Sequence-based typing of adeB as a potential tool to identify intraspecific groups among clinical strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. J. Clin. Microbiol. 43:5327–5331.
13. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. 2001. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. Antimicrob. Agents Chemother. 45:3375–3380.
14. Sun JR, Chan MC, Chang TY, Wang WY, Chiueh TS. 2010. Overexpression of the adeB gene in clinical isolates of tigecycline-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* without insertion mutations in adeRS. Antimicrob. Agents Chemother. 54:4934–4938.
15. Sun JR, Perng CL, Chan MC, Morita Y, Lin JC, Su CM, Wang WY, Chang TY, Chiueh TS. 2012. A truncated AdeS kinase protein generated by ISAbal1 insertion correlates with tigecycline resistance in *Acinetobacter baumannii*. PLoS One 7:e49534. doi:10.1371/journal.pone.0049534.
16. Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, Thomas CP, Gordon NC, Wareham DW, Quinn J, Lolans K, Livermore DM, Woodford N. 2010. AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 65:1589–1593.
17. Peleg AY, Adams J, Paterson DL. 2007. Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 51:2065–2069.
18. Rosenfeld N, Bouchier C, Courvalin P, Périchon B. 2012. Expression of the resistance-nodulation-cell division pump AdeJIK in *Acinetobacter*

- baumannii* is regulated by AdeN, a TetR-type regulator. Antimicrob. Agents Chemother. 56:2504–2510.
19. Roca I, Marti S, Espinal P, Martinez P, Gibert I, Vila J. 2009. CraA, a major facilitator superfamily efflux pump associated with chloramphenicol resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 53:4013–4014.
  20. Su XZ, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. 2005. AbeM, an H<sup>+</sup>-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. Antimicrob. Agents Chemother. 49:4362–4364.
  21. Rajamohan G, Srinivasan VB, Gebreyes WA. 2010. Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 65:1919–1925.
  22. Akers KS, Mende K, Yun HC, Hospenthal DR, Beckius ML, Yu X, Murray CK. 2009. Tetracycline susceptibility testing and resistance genes in isolates of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex from a U.S. military hospital. Antimicrob. Agents Chemother. 53:2693–2695.
  23. Fernández-Cuenca F, Tomás-Carmona M, Caballero-Moyano F, Bou G, Martínez-Martínez L, Vila J, Pachón J, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Pascual A, Grupo del Proyecto GEIH-REIPI-Ab 2010. 2013. In vitro activity of 18 antimicrobial agents against clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: multicenter national study GEIH-REIPI-Ab 2010. Enferm. Infect. Microbiol. Clin. 31:4–9. (In Spanish.)
  24. Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L, Vila J, Roca I. 2012. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. Clin. Microbiol. Infect. 18:1097–1103.
  25. Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys G, Verschraegen G. 1995. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. J. Clin. Microbiol. 33:11–15.
  26. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. 2006. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. J. Clin. Microbiol. 44:2974–2976.
  27. Zander E, Higgins PG, Fernández-González A, Seifert H. 2013. Detection of intrinsic bla(OXA-51-like) by multiplex PCR on its own is not reliable for the identification of *Acinetobacter baumannii*. Int. J. Med. Microbiol. 303:88–89.
  28. Zhang L, Ding G, Wei L, Pan X, Mei L, Zhang Y, Lu Y. 2011. Establishment of a novel target-based real-time quantitative PCR method for *Acinetobacter baumannii* detection. Diagn. Mol. Pathol. 20:242–248.
  29. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, Heersma H, Dijkshoorn L. 2005. Standardization and inter-laboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. J. Clin. Microbiol. 43:4328–4335.
  30. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33:2233–2239.
  31. Nemec A, Krizová L, Maixnerová M, Diancourt L, van der Reijden TJ, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. 2008. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. J. Antimicrob. Chemother. 62:484–489.
  32. Pannek S, Higgins PG, Steinke P, Jonas D, Akova M, Bohnert JA, Seifert H, Kern WV. 2006. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenylarginine-beta-naphthylamide. J. Antimicrob. Chemother. 57:970–974.
  33. Akers KS, Chaney C, Barsoumian A, Beckius M, Zera W, Yu X, Guymon C, Keen EF, III, Robinson BJ, Mende K, Murray CK. 2010. Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in *Acinetobacter baumannii*-*calcoaceticus* complex. J. Clin. Microbiol. 48:1132–1138.
  34. Walther-Rasmussen J, Høiby N. 2006. OXA-type carbapenemases. J. Antimicrob. Chemother. 57:373–383.
  35. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. 2009. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 53:5035–5038.
  36. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. 2007. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. J. Antimicrob. Chemother. 59:321–322.
  37. Miranda CD, Kehrenberg C, Ulep C, Schwarz S, Roberts MC. 2003. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. Antimicrob. Agents Chemother. 47:883–888.
  38. Ribera A, Ruiz J, Vila J. 2003. Presence of the Tet M determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 47:2310–2312.
  39. Tomás M, Doumith M, Warner M, Turton JF, Beceiro A, Bou G, Livermore DM, Woodford N. 2010. Efflux pumps, OprD porin, AmpC beta-lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. Antimicrob. Agents Chemother. 54:2219–2224.
  40. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, Macia MD, Rodríguez C, Moya B, Zamorano L, Suárez C, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). 2011. Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. Antimicrob. Agents Chemother. 55:1906–1911.
  41. Merino M, Acosta J, Poza M, Sanz F, Beceiro A, Chaves F, Bou G. 2010. OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. Antimicrob. Agents Chemother. 54:2724–2727.
  42. Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J. 2007. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. Clin. Microbiol. Infect. 13:1192–1198.
  43. Hornsey M, Loman N, Wareham DW, Ellington MJ, Pallen MJ, Turton JF, Underwood A, Gaulton T, Thomas CP, Doumith M, Livermore DM, Woodford N. 2011. Whole-genome comparison of two *Acinetobacter baumannii* isolates from a single patient, where resistance developed during tigecycline therapy. J. Antimicrob. Chemother. 66:1499–1503.
  44. Coyne S, Guigon G, Courvalin P, Périchon B. 2010. Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* with a microarray. Antimicrob. Agents Chemother. 54:333–340.
  45. Damier-Piolle L, Magnet S, Bremont S, Lambert T, Courvalin P. 2008. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 52:557–562.
  46. de Cristóbal RE, Vincent PA, Salomón RA. 2006. Multidrug resistance pump AcrAB-TolC is required for high-level, Tet(A)-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli*. J. Antimicrob. Chemother. 58:31–36.
  47. Agerø Y, Guardabassi L. 2005. Identification of Tet 39, a novel class of tetracycline resistance determinant in *Acinetobacter* spp. of environmental and clinical origin. J. Antimicrob. Chemother. 55:566–569.
  48. Marti S, Sánchez-Céspedes J, Alba V, Vila J. 2009. In vitro activity of doripenem against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Int. J. Antimicrob. Agents 33:181–182.
  49. Asadollahi K, Taherikalani M, Maleki A, Alizadeh E, Valadbaigi H, Soroush S, Maleki H, Asadollahi P, Emameini M. 2011. Diversity of aminoglycoside modifying enzyme genes among multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes isolated from nosocomial infections in Tehran hospitals and their association with class 1 integrons. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 58:359–370.



### **3.2. Artículo II: Transferencia horizontal del gen *OXA-24* a través de vesículas de membrana externa: un nuevo mecanismo de diseminación de genes de resistencia a carbapenemas en *A. baumannii***

La resistencia de *A. baumannii* a carbapenemas es uno de los problemas más preocupantes en los hospitales. El principal mecanismo de resistencia a carbapenemas de esta bacteria es la expresión de  $\beta$ -lactamasas (metalo- $\beta$ -lactamasas o  $\beta$ -lactamasas de clase D tipo OXA), siendo importantes también las alteraciones en la permeabilidad de la bacteria y la modificación de las PBP (65). A pesar de la importancia de este problema, los sistemas de diseminación de los genes codificantes para  $\beta$ -lactamasas en cepas de *A. baumannii* no se conocen por completo.

En el estudio del que se ocupa este capítulo se usaron dos cepas clínicas resistentes a carbapenemas de *A. baumannii*, concretamente las cepas AbH12O-A2 y AbH12O-CU3, las cuales contienen un plásmido portador del gen *bla<sub>OXA-24</sub>* (los plásmidos pMMA2 y pMMC3, respectivamente). OMVs de ambas cepas clínicas fueron recogidas mediante ultracentrifugación y visualizadas por MET. Se confirmó la presencia de LPS mediante un kit comercial, confirmando así su procedencia de la membrana externa. Las OMVs obtenidas estaban libres de contaminantes, tal y como se confirmó mediante su visualización con MET y mediante su siembra en MH, tanto en placa como en medio líquido.

Para demostrar la capacidad de la transmisión del gen *bla<sub>OXA-24</sub>* a través de OMVs, experimentos de transformación fueron llevados a cabo incubando OMVs purificadas de ambas cepas clínicas con la cepa sensible *A. baumannii* ATCC 17978. En los transformantes obtenidos, la presencia del gen fue confirmada por PCR, y los resultados de CMIs obtenidos presentaron un perfil compatible con la expresión del gen *bla<sub>OXA-24</sub>* (192), esto es, indicando resistencia a penicilina, un ligero incremento en la CMI a cefepime, y un alto grado de resistencia a carbapenemas. Así, las CMIs de *A. baumannii* ATCC 17978 transformada pasaron de 0.38, 0.75, 0.19  $\mu\text{g/mL}$  a  $> 32 \mu\text{g/mL}$  tras la transformación con OMVs.

Los controles negativos realizados incubando la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 con los plásmidos libres pMMA2 y pMMCU3 y con la misma cantidad de OMVs utilizada en los experimentos de transformación lisadas con Triton X-100 no produjeron colonias transformantes. Sin embargo, OMVs tratadas con DNasa I (para eliminar el ADN externo a las OMVs) y proteinasa K (para hidrolizar los posibles fagos presentes, y liberar su contenido) produjo transformantes, aunque la eficiencia del proceso se vio disminuida. Esta pérdida de eficiencia fue debida a los tratamientos previos de DNasa y proteinasa K, los cuales dañaron la integridad de las OMVs. Con todo esto, se demuestra que la eficiencia del proceso depende de la integridad de las OMVs, la cual es estrictamente necesaria.

Experimentos consistentes en incubar la cepa sensible *A. baumannii* ATCC 17978 en sobrenadantes obtenidos de cultivos de la cepa clínica AbH12O-A2 como fuente de OMVs demostraron que la transformación se lleva a cabo. Esto es indicativo de que las OMVs, bajo condiciones más fisiológicas como las ensayadas en este experimento, son liberadas y capaces de transformar las bacterias circundantes. La transformación fue detectada tras 3 horas de incubación, y su eficiencia se incrementa a medida que avanza el tiempo hasta llegar a las 24 horas, en las cuales se alcanza el máximo. Incubaciones durante mayores periodos de tiempo no incrementan el número de transformantes.

Para demostrar la presencia de los plásmidos pMMA2 y pMMCU3 con el gen *bla*<sub>OXA-24</sub> en las OMVs, se realizaron experimentos de Dot Blot utilizando el propio gen como sonda. Tanto OMVs recogidas de ambas cepas clínicas como aquellas obtenidas de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 transformada hibridaron con la sonda *bla*<sub>OXA-24</sub>. Con esto, se confirmó definitivamente la presencia del gen en las OMVs, y quedaba demostrada la universalidad del proceso.

Por otra parte, la caracterización genotípica por REP-PCR de los transformantes obtenidos mostraron que no había diferencias entre los patrones



de bandas de estas cepas y la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 sin transformar, confirmándose así que la presencia de transformantes no es debida a contaminaciones de las cepas clínicas, sino que se trata de la cepa original. Finalmente, la transferencia horizontal de plásmidos entre las cepas clínicas y *A. baumannii* ATCC 17978 fue confirmada por PCR basada en huella genética de los plásmidos pMMA2 y pMMC3.





## Horizontal Transfer of the OXA-24 Carbapenemase Gene via Outer Membrane Vesicles: a New Mechanism of Dissemination of Carbapenem Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii*<sup>▽</sup>

Carlos Rumbo,<sup>1†</sup> Esteban Fernández-Moreira,<sup>1†</sup> María Merino,<sup>1†</sup> Margarita Poza,<sup>1</sup>  
 Jose Antonio Mendez,<sup>1</sup> Nelson C. Soares,<sup>1</sup> Alejandro Mosquera,<sup>2</sup>  
 Fernando Chaves,<sup>3</sup> and Germán Bou<sup>1\*</sup>

Servicio de Microbiología,<sup>1</sup> and Departamento Xenética,<sup>2</sup> Complejo Hospitalario Universitario A Coruña-INIBIC, C/Xubias de Arriba s/n, 15006 La Coruña, and Servicio de Microbiología, Hospital 12 de Octubre, Madrid,<sup>3</sup> Spain

Received 8 July 2010/Returned for modification 8 September 2010/Accepted 12 April 2011

The resistance of *Acinetobacter baumannii* strains to carbapenems is a worrying problem in hospital settings. The main mechanism of carbapenem resistance is the expression of  $\beta$ -lactamases (metalloenzymes or class D enzymes). The mechanisms of the dissemination of these genes among *A. baumannii* strains are not fully understood. In this study we used two carbapenem-resistant clinical strains of *A. baumannii* (AbH120-A2 and AbH120-CU3) expressing the plasmid-borne *bla*<sub>OXA-24</sub> gene (plasmids pMMA2 and pMMC3, respectively) to demonstrate that *A. baumannii* releases outer membrane vesicles (OMVs) during *in vitro* growth. The use of hybridization studies enabled us to show that these OMVs harbored the *bla*<sub>OXA-24</sub> gene. The incubation of these OMVs with the carbapenem-susceptible *A. baumannii* ATCC 17978 host strain yielded full resistance to carbapenems. The presence of the original plasmids harboring the *bla*<sub>OXA-24</sub> gene was detected in strain ATCC 17978 after the transformation of OMVs. New OMVs harboring *bla*<sub>OXA-24</sub> were released by *A. baumannii* ATCC 17978 after it was transformed with the original OMV-mediated plasmids, indicating the universality of the process. We present the first experimental evidence that clinical isolates of *A. baumannii* may release OMVs as a mechanism of horizontal gene transfer whereby carbapenem resistance genes are delivered to surrounding *A. baumannii* bacterial isolates.

*Acinetobacter baumannii* exhibits an impressive panoply of mechanisms of antibiotic resistance (20, 21). The upregulation of innate resistance mechanisms and the acquisition of foreign determinants are observed for these bacteria. The acquisition of antibiotic resistance mediated by gene acquisition is frequently derived from the horizontal transfer of genes between different species in the environment or in clinical settings (19).

Outer membrane vesicles (OMVs) are used by bacteria in a secretion mechanism that leads to the delivery of various bacterial proteins and lipids into host cells, thus eliminating the need for bacterial contact with the host cell (2, 16, 18).

As *A. baumannii* is broadly distributed in the hospital environment and is a reservoir of antibiotic resistance genes, we wanted to know whether the OMVs released by *A. baumannii* could be vectors for the spread of antibiotic resistance genes, specifically for carbapenems. As is the case for many other Gram-negative bacteria, *A. baumannii* produces OMVs. The OMVs are typically spherical, are 50 to 200 nm in diameter, and are composed of outer membrane proteins, lipopolysaccharides (LPSs), periplasmic proteins, phospholipids, DNA, and RNA (1, 16, 27). From an energetic point of view, the production of these structures is so costly that it is difficult to consider the release of OMVs as a purposeless process. These

vesicles support a common function, as they are a means by which bacteria interact with prokaryotic and eukaryotic cells in their environment (16). OMVs have an important role in several bacterial activities as carriers for quorum-sensing molecules (18), toxin delivery (8, 26), the inhibition of the maturation of phagosomes in macrophages (11), and the formation of biofilms (28). The results of previous studies suggested that vesicles may be involved in the transfer of genetic material among similar bacterial species (6, 9, 14, 15). Yaron et al. previously demonstrated the transfer of virulence genes between *Escherichia coli* and other enteric bacteria and also demonstrated that intravesicle DNA was protected from DNase digestion, suggesting that DNA is packaged within vesicles (27).

On the other hand, carbapenem resistance in *A. baumannii* is due mainly to the presence of  $\beta$ -lactamases (class B metallo- $\beta$ -lactamases or class D OXA-type  $\beta$ -lactamases) as well as altered permeability and penicillin binding protein (PBP) modifications (21). The process by which  $\beta$ -lactamase genes are transferred cell to cell has not been studied in detail.

In the present study, we demonstrated for the first time that OMVs are vectors of plasmids carrying carbapenem resistance genes and that they may act by transferring a functional *bla*<sub>OXA-24</sub> carbapenem resistance gene between different strains of *A. baumannii*.

### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and antibiotic susceptibility testing.** *A. baumannii* clinical strains AbH120-A2 and AbH120-CU3 harboring plasmids pMMA2 and pMMC3, respectively, and both carrying the *bla*<sub>OXA-24</sub> gene (4, 19) were

\* Corresponding author. Mailing address: Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario La Coruña, C/Xubias de Arriba s/n, 15006 La Coruña, Spain. Phone: 34-981-176087. Fax: 34-981-176097. E-mail: German.Bou.Arevalo@sergas.es.

† C.R., E.F.-M., and M.M. contributed equally to this work.

<sup>▽</sup> Published ahead of print on 25 April 2011.

TABLE 1. DNA contents associated with outer membrane vesicles from different isolates of *Acinetobacter baumannii*

Source	Species	Plasmid	$\mu\text{g}$ of vesicle protein/ $\mu\text{l}$	ng of DNA/ $\mu\text{g}$ of vesicle protein
AbH12O-A2	<i>A. baumannii</i>	pMMA2	0.35	24.2
AbH12O-CU3	<i>A. baumannii</i>	pMMCUC3	0.16	146.5

used. These clinical strains were isolated during a large nosocomial outbreak in Madrid, Spain (19), and showed a broad antibiotic resistance profile, including resistance to carbapenems. The strains were identified to the species level by nucleotide sequencing of the 16S rRNA genes. Antibiotic susceptibility testing was performed by an Etest (bioMérieux) according to the manufacturer's instructions.

*A. baumannii* ATCC 17978 (24, 25) was used as a host for transformation experiments. *A. baumannii* strain ATCC 17978 is fully susceptible to carbapenems and produces biofilms moderately.

**Purification of OMVs.** Outer membrane vesicles (OMVs) were isolated from exponential-growth-phase cultures of *A. baumannii* clinical strains AbH12O-A2 and AbH12O-CU3 and from *A. baumannii* strain ATCC 17978. In brief, 500 ml of Mueller-Hinton (MH) broth was inoculated with 5 ml of a culture grown overnight and was incubated at 37°C overnight at 150 rpm. The cells were pelleted by centrifugation (14,000  $\times g$  for 10 min), and the supernatant was filtered through a 0.22- $\mu\text{m}$  membrane (Millipore Corporation, Bedford, MA) and subjected to ultracentrifugation (200,000  $\times g$  for 90 min at 4°C with a 70 Ti rotor [Beckman]). The vesicle pellet was resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4). The suspension was filtered again through a 0.22- $\mu\text{m}$  membrane (Millipore) and spread onto agar plates to test for any bacterial growth.

**Electron microscopy.** The vesicle suspension was fixed with 2.5% cold glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) for 2 h at 4°C and postfixed with 1% osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) for 1 h at 4°C. The sample was observed and photographed with a Jeol JEM 1010 transmission electron microscope (80 kV).

**Determination of DNA, proteins, and lipopolysaccharides in OMVs.** OMV proteins were quantified by a Bradford assay (5). For the quantification of the intravesicle DNA, OMV samples (88  $\mu\text{l}$ ) were treated with DNase (Invitrogen) to hydrolyze surface-associated DNA and free DNA in suspension. Reactions were stopped by the heat treatment of the mixtures for 10 min at 65°C. DNase-treated vesicles were then lysed with 0.125% Triton X-100 solution for 30 min at 37°C, and DNA was purified by the use of a High Pure PCR product purification kit (Roche). The DNA was quantified by using a Nanodrop ND-1000 instrument. The ratio of DNA to  $\mu\text{g}$  of protein vesicle was determined (Table 1). The presence of lipopolysaccharides (LPSs) in the outer membrane vesicle samples was tested by using the ToxinSensor Chromogenic LAL endotoxin assay kit (GenScript) according to the manufacturer's instructions.

**OMV-mediated transformation.** Transformation experiments were performed according to a method described previously by Yaron et al. (27). In brief, *A. baumannii* strain ATCC 17978 was cultured in MH broth at 37°C at 150 rpm for 3 to 4 h to an optical density at 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) of 0.4. Cells were pelleted and resuspended in cold SOC medium (2% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.4% glucose, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgSO}_4$ ) at  $10^7$  CFU/ml. This cell suspension (60  $\mu\text{l}$ ) was mixed with different amounts of purified vesicles (containing 1, 5, 10, and 20  $\mu\text{g}$  of protein) obtained from *A. baumannii* clinical strains H12O-A2 and H12O-CU3 (Table 1). The suspensions were incubated statically for 4 h at 37°C and then for another 4 h with shaking (150 rpm). Ten milliliters of MH broth was then added to the suspension, and the incubation continued at 37°C overnight with shaking (150 rpm). The broth culture grown overnight was pelleted at 10,000  $\times g$  and resuspended in 100  $\mu\text{l}$  of MH broth. *A. baumannii* ATCC 17978 transformants were selected on LB agar plates with 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of ampicillin. Negative controls included a transformation experiment performed under identical conditions but with approximately the same amount of free plasmid DNA instead of DNA packed into 20  $\mu\text{g}$  of OMV protein (1,000 ng and 2,300 ng of free plasmid of pMMA2 and pMMCUC3, respectively). All experiments were carried out in duplicate and repeated twice. To further demonstrate that DNA transfer was vesicle mediated, separate experiments were conducted with 20  $\mu\text{g}$  of OMVs previously lysed with Triton X-100 for 30 min at 37°C, as previously described (27), and with OMVs previously treated with 50  $\mu\text{g}$  of proteinase K (Sigma)/ml for 30 min at 37°C and with 2 U of DNase I (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's instructions.

TABLE 2. Oligonucleotides used in this work

Primer	Sequence (5'-3')	Use(s)
REP Forw	TTTGCGCCGTCATCAGGC	REP-PCR
REP Rev	ACGTCTTATCAGGCCTAC	REP-PCR
OXA24 Forw	AAACTAAATCTGAAGATA	Dot blot and plasmid
	ATTTT	PCR fingerprinting
OXA24 Rev	GAGCGAAAAGGGGATTTT	Plasmid PCR
IS4 Forw	GCATTAGTTTCATGAATTGC	fingerprinting
IS4 Rev	GATCAGAAAGTCTATGCC	Plasmid PCR
IS4 Forw bis	CACTCGTCTATGCATCTA	fingerprinting
		Plasmid PCR
		fingerprinting

Proteinase K was used to hydrolyze phage coats and release phage contents. It was then removed from treated samples by using microconcentrators that exclude molecules with an  $M_r$  of <30,000 (Amicon Ultra-0.5; Millipore). DNase was added to treated vesicle preparations to degrade released free DNA.

To demonstrate that OMV concentrations normally found in culture supernatants are able to mediate plasmid transfer, additional experiments were performed by using the supernatant obtained from a fresh bacterial culture of clinical strain AbH12O-A2 at the stationary phase of growth in the presence of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of ampicillin. The cells were pelleted by centrifugation (4,000 rpm for 15 min), and the supernatant was filtered through a 0.22- $\mu\text{m}$  membrane (Millipore Corporation, Bedford, MA). Twenty milliliters of supernatant was inoculated with 2 ml of a culture of *A. baumannii* ATCC 17978 grown overnight. Next, after incubation at 3, 6, 24, and 36 h, 200  $\mu\text{l}$  was plated onto LB agar plates supplemented with 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of ampicillin. Controls included the supernatant treated with Triton X-100, DNase, and free plasmid DNA (in a concentration similar to that for OMVs).

**Dot blotting.** The *bla*<sub>OXA-24</sub> gene was used as a probe for hybridization procedures. The DNA probe was made by amplifying the *bla*<sub>OXA-24</sub> gene from clinical strain AbH12O-A2 with the primers described in Table 2. The amplified fragment was labeled with digoxigenin (DIG)-11-dUTP (Roche Applied Science) at dilutions of 1/3 for DIG-UTP and 2/3 for TTP. Excess DIG-dUTP was removed with a Sephadex G-50 column (Roche).

The DNA from the OMVs was denatured for 10 min at 96°C and cooled on ice before dot blotting onto a Hybond-N<sup>+</sup> membrane (Amersham Bioscience). The membrane was cross-linked by UV irradiation at 254 nm and 120 J/cm<sup>2</sup> in a Biolink BLX 254 UV cross-linker (Vilbert Lourmat). The membrane was pre-hybridized in a solution containing 7% SDS, 1 mM EDTA, and 0.25 M disodium phosphate for 30 min at 60°C. The oligonucleotide digoxigenin probe was then added to the solution and incubated overnight at 60°C. The membrane was then washed twice with 2 $\times$  SSC (1 $\times$  SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate) plus 1% (wt/vol) SDS for 15 min at room temperature and twice with 0.1 $\times$  SSC plus 0.1% (wt/vol) SDS for 30 min at 60°C and was then blocked for 30 min with 1% (wt/vol) blocking reagent and incubated for 30 min at 37°C with an anti-DIG-alkaline phosphatase conjugate (Roche diagnostic) diluted 1:10,000 in blocking solution. The unbound antibody conjugate was removed by washing three times with 100 ml of washing buffer containing 1 $\times$  SSC and 1% (wt/vol) SDS. The membrane was placed between two cellulose acetate sheets, and 0.5 ml/100 cm<sup>2</sup> of CSPD [disodium 3-(4-methoxyphosphoryl)-1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3,3,1.1<sup>3,7</sup>]decane-4-yl]phenyl phosphate] was added to the membrane, between the acetate sheet sandwiches. The air bubbles were removed carefully, the acetate sheets were sealed, and the membrane was incubated for 5 min at room temperature. Finally, the membrane was exposed to Kodak XAR-5 X-ray film for 60 min.

**REP-PCR.** The primers used to perform repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR) are described in Table 2. The procedure was performed as previously reported (3). Two strains were considered to belong the same genotype when they shared the same pattern of bands, and a maximum difference of two bands was considered acceptable.

**Plasmid analysis.** PCR assays were performed to confirm the presence of plasmids pMMA2 and pMMCUC3 in the *A. baumannii* ATCC 17978 transformants. The oligonucleotides were designed from the sequences of pMMA2 and pMMCUC3 deposited in the GenBank database (accession numbers GQ377752 and GQ904227, respectively). The sequences of the oligonucleotides are described in Table 2. The PCR was performed under the following conditions: a denaturation step for 10 min at 94°C; an amplification step consisting of 30 cycles

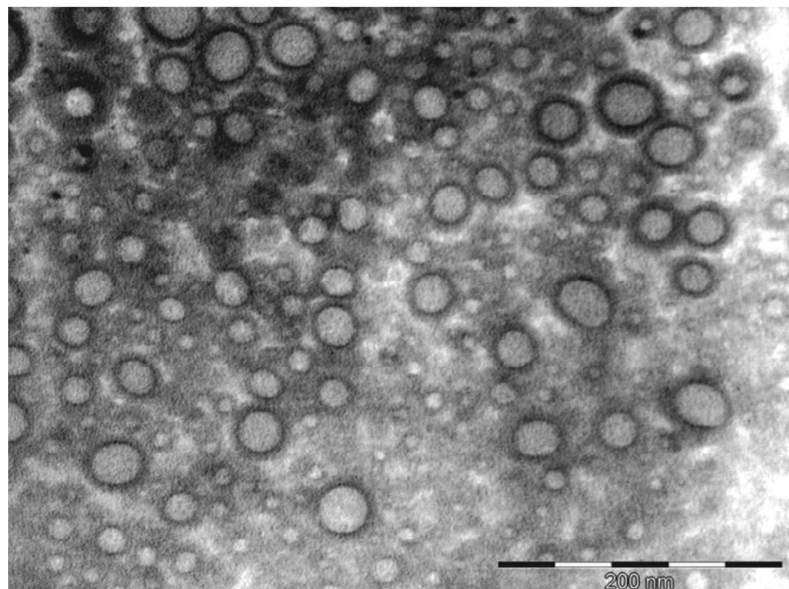


FIG. 1. Electron microscopy micrograph of OMVs released by *A. baumannii* clinical strain AbH12O-A2. Vesicles were purified from broth cultures by ultracentrifugation and filtered through a 0.22- $\mu$ m filter. The average diameter of the vesicles was 40 nm. The OMVs were free of contaminating bacteria.

of 1 min at 94°C, 1 min at 52°C, and 4 min at 72°C; and an elongation step for 16 min at 72°C. The samples were visualized on a 0.5% agarose gel.

## RESULTS

**OMVs harboring the *bla*<sub>OXA-24</sub> gene are released from *Acinetobacter baumannii* cells.** Transmission electron microscopy analysis revealed outer membrane vesicles (OMVs) from *A. baumannii* cells collected at the exponential phase of growth, thus suggesting that this bacterium actively releases OMVs during growth in broth culture (Fig. 1). The vesicles had an intact bilayer membrane, contained electron-dense material, and ranged in diameter from 20 to 100 nm (with vesicles with a diameter of 40 nm being the most abundant). The vesicles were uniform and spherical and did not have flagella. Moreover, the presence of LPS was detected in the OMVs (data not shown), confirming that they were derived from outer membrane. In all assays, the LPS concentration obtained from OMV samples was out of the measurement range ( $>2$  units of endotoxin/ml). The OMVs were well purified, since no bacteria were visualized by electron microscopy, and contamination controls on culture plates did not show any growth.

**Transformation experiments.** Colonies were obtained on LB agar plates at each dose of purified OMVs when *A. baumannii* ATCC 17978 was transformed after incubation with OMVs purified from both *A. baumannii* clinical strains (Table 3). The amplification of *bla*<sub>OXA-24</sub> from all transformants was achieved by PCR (data not shown).

*A. baumannii* clinical isolates AbH12O-A2 and AbH12O-CU3 showed a broad profile of  $\beta$ -lactam resistance, including resistance to carbapenems (Table 4). *A. baumannii* ATCC

17978 transformed with OMVs from clinical strains AbH12O-A2 and AbH12O-CU3 showed a profile of MIC values compatible with the expression of *bla*<sub>OXA-24</sub> (4), thus indicating resistance to penicillin, a slight increase in the cefepime MIC, and a high degree of resistance to carbapenems. In all cases, imipenem, meropenem, and doripenem MICs for *A. baumannii* isolate ATCC 17978 increased from 0.38, 0.75, and 0.19  $\mu$ g/ml, respectively, to  $>32$   $\mu$ g/ml after transformation with OMVs (Table 4).

In parallel, no transformants were obtained when *A. baumannii* ATCC 17978 was incubated with 1,000 ng and 2,300 ng of free naked plasmid obtained from clinical isolates AbH12O-A2 and AbH12O-CU3, respectively (pMMA2 and pMMCU3, respectively), or with the same amount of OMVs

TABLE 3. OMV-mediated transformants obtained after 24 h of incubation with 10  $\mu$ g of OMVs in plates of LB agar plates supplemented with 500  $\mu$ g/ml of ampicillin

Treatment	No. of transformants	% of transformants <sup>d</sup>
ATCC 17978 + OMVs	440	100
ATCC 17978 + OMVs treated with DNase and proteinase K <sup>a</sup>	316	72
ATCC 17978 + OMVs treated with Triton X-100 <sup>a</sup>	0	
ATCC 17978 + pMMA2 <sup>b</sup>	0	
ATCC 17978 <sup>c</sup>	0	

<sup>a</sup> See Materials and Methods.

<sup>b</sup> Free plasmid at concentrations similar to those found in OMVs.

<sup>c</sup> Negative control, *A. baumannii* ATCC 17978 incubated alone.

<sup>d</sup> Data are the mean values from triplicate experiments.

TABLE 4. Antibiotic susceptibility profiles of *A. baumannii* clinical strains AbH12O-A2 and AbH12O-CU3, the host strain *A. baumannii* ATCC 17978, and *A. baumannii* ATCC 17978 transformed with OMVs of the indicated clinical strains

Antibiotic	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	AbH12O-A2 (pMMA2)	AbH12O-CU3 (pMMCU3)	ATCC 17978	ATCC 17978 <sup>a</sup> (OMV-pMMA2)	ATCC 17978 <sup>a</sup> (OMV-pMMCU3)
Amoxicillin	>256	>256	96	>256	>256
Amoxicillin-clavulanic acid	>256	>256	48	>256	>256
Piperacillin-tazobactam	>256	>256	2	>256	>256
Cefotaxime	>256	>256	32	32	32
Ceftazidime	>256	>256	12	12	12
Cefepime	>256	>256	6	16	16
Amikacin	>256	>256	3	4	3
Tobramycin	12	4	0.5	0.5	0.5
Gentamicin	>256	>256	0.5	0.5	0.5
Imipenem	>32	>32	0.38	>32	>32
Meropenem	>32	>32	0.75	>32	>32
Doripenem	>32	>32	0.19	>32	>32

<sup>a</sup> ATCC 17978 transformed with the OMVs from *A. baumannii* AbH12O-A2 and AbH12O-CU3 and harboring plasmids pMMA2 and pMMCU3, respectively.

previously lysed with Triton X-100 for 30 min at 37°C (negative controls). Almost the same numbers of transformants were obtained when the OMVs were previously treated with 50  $\mu\text{g}$  of proteinase K/ml and with 2 U of DNase I (Table 3). It is important that in the process of the inactivation of DNase at 65°C, damage to the integrity of OMVs occurs, thus reducing the transformation efficiency (data not shown). Overall, OMV-mediated *A. baumannii* transformation is strongly dependent on the integrity of the OMVs protecting the plasmid DNA inside OMVs.

Moreover, and in order to demonstrate whether supernatants of bacterial cultures are responsible for OMV-mediated transformation, a time-response experiment was performed by using culture supernatants of AbH12O-A2 cells as a source of OMVs. Interestingly, in these cases, several transformants were obtained (Fig. 2). This revealed that OMVs under more physiological conditions are released from cells and are mobilized by transformation into the surrounding bacterial cells. The process of transformation through OMVs is detected within 3 h of incubation and increases to 24 h, then reaching a

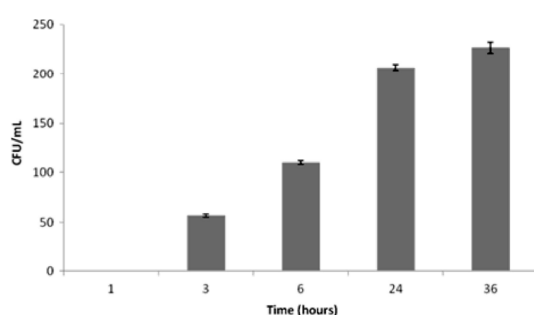


FIG. 2. Time-response experiment with supernatants from AbH12O-A2 as a source of OMVs. Shown are numbers of colonies resistant to ampicillin (transformants) obtained at different times of incubation of *A. baumannii* ATCC 17978 with supernatant from AbH12O-A2. At least three replicate experiments were performed, and each experiment had results similar to those shown. Error bars indicate the standard deviations for replicate samples.

plateau. Longer incubation times did not significantly increase the number of transformants (Fig. 2).

To demonstrate that the OMVs carried the pMMA2 and pMMCU3 clinical plasmids harboring *bla*<sub>OXA-24</sub>, a dot blot experiment was performed with the *bla*<sub>OXA-24</sub> gene as a probe. The OMVs collected from *A. baumannii* clinical strains AbH12O-A2 and AbH12O-CU3 hybridized with the *bla*<sub>OXA-24</sub> probe are shown in Fig. 3A. These results strongly suggest that OMVs released from the *A. baumannii* clinical strains harbored plasmids carrying the *bla*<sub>OXA-24</sub> carbapenemase gene.

To demonstrate the universality of the process, *A. baumannii* strain ATCC 17978 cells transformed with OMVs from clinic isolates AbH12O-A2 and AbH12O-CU3 were also analyzed by dot blot analysis. In the case of clinical strains AbH12O-A2 and AbH12O-CU3, the ATCC isolate trans-

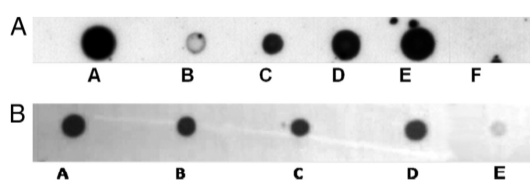


FIG. 3. (A) Dose-response experiment. Shown is a dot blot analysis for detecting the presence of the *bla*<sub>OXA-24</sub> gene in OMVs released from *A. baumannii* clinical isolate AbH12O-A2. Blot A, 10  $\mu\text{l}$  of purified plasmid pMMA2 as a positive control; blot B, 10  $\mu\text{l}$  of the OMV suspension (see concentration in Table 1); blot C, 50  $\mu\text{l}$  of the OMV suspension; blot D, 100  $\mu\text{l}$  of the OMV suspension; blot E, 200  $\mu\text{l}$  of the OMV suspension; blot F, 100  $\mu\text{l}$  of the OMV suspension from *A. baumannii* ATCC 17978 mock transformed as a negative control (equal amount of OMVs with respect to that in blot E). All samples were concentrated to a final volume of 10  $\mu\text{l}$  before the experiment, and 5  $\mu\text{l}$  of each sample was analyzed by dot blotting. (B) Dot blot analysis to detect the presence of the *bla*<sub>OXA-24</sub> gene in OMVs released from *A. baumannii* clinical isolates AbH12O-A2 and AbH12O-CU3 (blots A and B, respectively) and from *A. baumannii* ATCC 17978 transformed with OMVs from clinic isolates AbH12O-A2 and AbH12O-CU3 (blots C and D, respectively). The mock-transformed *A. baumannii* strain ATCC 17978 (blot E) was used as a negative control. Equal amounts of OMVs of each sample were analyzed in the dot blots.



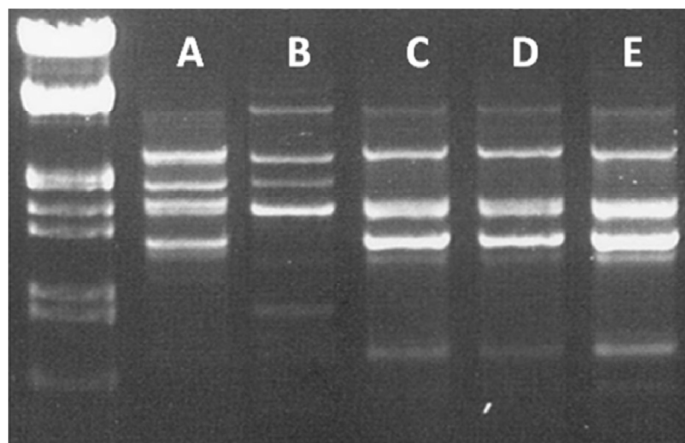


FIG. 4. REP-PCR profile of the *A. baumannii* strains used in this study. Blot A, AbH12O-A2; blot B, AbH12O-CU3; blot C, ATCC 17978; blot D, ATCC 17978 transformed with OMVs from AbH12O-A2; blot E, ATCC 17978 transformed with OMVs from AbH12O-CU3.

formed with OMVs carrying clinical plasmids pMMA2 and pMCMU3 released OMVs harboring the *bla*<sub>OXA-24</sub> gene (Fig. 3B).

**REP-PCR and plasmid analysis.** Although the purified OMVs used for the vesicle transformation experiments were free of contaminating bacterial cells (original clinical isolates AbH12O-A2 and AbH12O-CU3), *A. baumannii* ATCC 17978 cells transformed with the OMV-mediated clinical plasmids were genotypically characterized by REP-PCR (Fig. 4). There was no difference in the band profiles of amplified fragments between *A. baumannii* strain ATCC 17978 and the strains obtained after OMV transformation, thus ruling out the presence of the original clinical strains on the plates after OMV-mediated transformation experiments. To support this conclusion, OMVs purified directly from clinical strains AbH12O-A2 and AbH12O-CU3 were inoculated onto LB broth and LB agar plates. No bacterial growth was detected after 24 or 48 h of incubation, thus indicating that there were no viable microorganisms present in the purified OMVs.

Since *A. baumannii* ATCC 17978 naturally carries two plasmids, pAB1 and pAB2, of 11,302 and 13,408 bp, respectively (24), the interpretation of the restriction fragment length polymorphism (RFLP) profile after OMV-mediated plasmid transformation is difficult. Therefore, OMV-mediated plasmid transfer between clinical isolates and ATCC 17978 was confirmed by PCR fingerprinting of plasmids pMMA2 and pMCMU3 by using a set of oligonucleotides (Table 2).

For plasmid pMMA2, oligonucleotides IS4 forw bis and IS4 rev were used to amplify the 3,339-bp band, IS4 forw and IS4 rev were used to amplify the 1,477-bp band, and OXA24 forw and OXA24 rev were used to amplify the 651-bp band. For pMCMU3, oligonucleotide pairs IS4 forw bis and IS4 rev, OXA24 forw and OXA24 rev, and IS4 forw and IS4 rev were used to amplify bands of 2,436 bp, 675 bp, and 591 bp, respectively (Fig. 5). Data confirm the horizon-

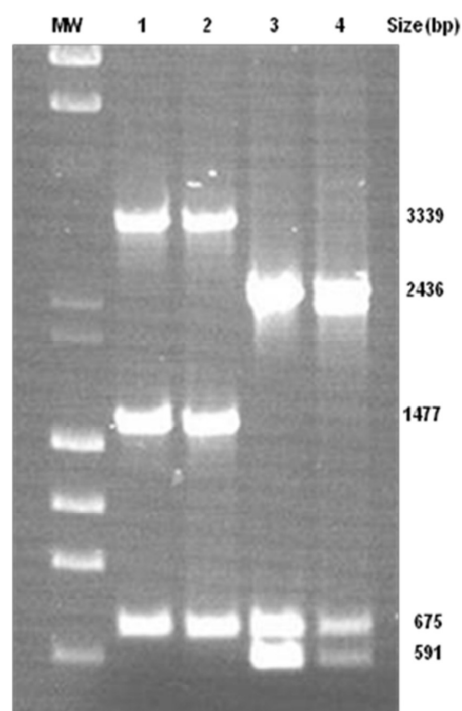


FIG. 5. PCR fingerprinting profile of plasmids pMMA2 and pMCMU3, determined by using a set of oligonucleotides. Lane 1, PCR fingerprint of plasmids isolated from strain AbH12O-A2; lane 2, PCR fingerprint of plasmids isolated from strain ATCC 17978 transformed with OMVs from AbH12O-A2; lane 3, PCR fingerprint of plasmids isolated from strain AbH12O-CU3; lane 4, PCR fingerprint of plasmids isolated from strain ATCC 17978 transformed with OMVs from AbH12O-CU3 as a source. MW,  $\lambda$  DNA-HindIII and  $\phi$ 174 DNA-HaeIII mix.

tal transfer of plasmids between clinical isolates and the host strain ATCC 17978.

### DISCUSSION

Both pathogenic and nonpathogenic species of Gram-negative bacilli secrete vesicles. Studies of these bacterial outer membrane vesicles support a common role for the vesicles as the means by which bacteria interact with prokaryotic and eukaryotic cells in their environment (16, 18). OMV-mediated toxin delivery is a potent virulence mechanism exhibited by different Gram-negative microorganisms; i.e., proteases and leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Shiga toxin from Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), VacA from *Helicobacter pylori*, and multiple virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa*, including  $\beta$ -lactamase, alkaline phosphatase, hemolytic phospholipase C, and Cif (a recently characterized toxin secreted by *Pseudomonas aeruginosa*), have been observed to be delivered over long distances via OMVs (2). The mechanism is therefore an effective means of delivering bacterial virulence factors.

However, as well as lipids and proteins, double-stranded DNA has been recovered from the membrane vesicles of the ruminal cellulolytic *Ruminococcus* genus (14), suggesting that this membrane-associated transformation system may play a role in lateral gene transfer in complex microbial ecosystems such as the rumen. In addition, the vesicle-mediated transfer of virulence genes from *E. coli* O157:H7 to other enteric bacteria has been reported, suggesting that OMVs may act as a transfer system for the delivery of genetic material to other microorganisms (27). Moreover, there are no reports of the importance of this DNA transfer system with regard to having any clinical impact on the transfer of carbapenem resistance genes or affecting human microbiota.

DNA can be exchanged between bacteria by conjugation, transduction, or transformation (10). During transformation, DNA is taken up directly by cells. The bacteria from which the DNA was taken are called donors, and the bacteria to which the DNA has been added are called recipients. Bacteria that have taken up DNA are called transformants. In the current concept of the transformation process, bacterial donors may need to be lysed in advance to release the free DNA in order for it to be taken up by the recipient. Here we report data showing that *A. baumannii* strains release OMVs able to carry the *bla*<sub>OXA-24</sub> carbapenem resistance gene without a loss of viability, thus constituting a possible way of disseminating plasmids with antibiotic resistance genes of clinical impact.

It is important that (i) OMVs are produced by growing cells and are not a product of cell lysis or cell death (10), (ii) pathogenic strains can produce between 10 and >25 times more vesicles than nonpathogenic strains (10), (iii) *P. aeruginosa* PAO1 cells grown under oxygen stress conditions demonstrate an increase in vesicle formation (23), and (iv) vesicles from both intracellular and extracellular bacterial pathogens have been identified in diverse infected host tissues, revealing the ability of vesicles to access a variety of environments within the host (12).

For the above-mentioned reasons, it may be hypothesized that OMVs are important not only for the virulence of a specific pathogen in a process of infection or host interaction

but also because during this process, the release of OMVs may favor the spread of antibiotic resistance genes (including genes for resistance to carbapenems) to surrounding bacteria. This is supported by the fact that the DNA inside OMVs is somehow protected from the action of nucleases (as in the present study), which may be present in the environment or in the host tissues, thus favoring the exchange of genetic material or the process of the horizontal transfer of DNA, thus probably conferring an additional advantage for the process of gene dissemination to those microorganisms able to release OMVs.

The overall data presented here may add some novelty to the notion of horizontal DNA transfer, at least between strains of *A. baumannii* that may release "OMV-protected DNA" while remaining viable. This process appears to occur continuously, since once a bacterial strain is transformed with OMVs (i.e., *A. baumannii* isolate ATCC 17978), this bacterial isolate is also able to release OMVs harboring the plasmid that was previously taken up (Fig. 3).

To explain the presence of DNA inside OMVs, we propose two possible mechanisms. (i) OMVs contain proteins and lipids from the outer membrane and periplasm which are absent from the inner membrane and cytoplasm, as described previously by Kuehn and Kesty (16). This suggests that the plasmids have to migrate in some way to the periplasm, where they are trapped in OMVs. (ii) OMVs also have some proteins from the inner membrane, as described previously by Kwon et al. (17). Proteomic analysis of the OMVs from clinical strain H12O-A2, revealed a typical profile for the outer membrane (for example, porins), but we also detected inner membrane proteins (at least 13% of OMV proteins), e.g., tolerance to colicins E2, E, A, and K, required for outer membrane integrity; membrane-bound lytic murein transglycosylase B; an ABC-type transport system; a succinate dehydrogenase flavo subunit; the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase beta-subunit; L-sorbose dehydrogenase; and others (data not shown). These results suggest that some OMVs could contain both inner and outer membrane compounds, trapping cytoplasmic compounds and even plasmids, which was demonstrated previously for other species (13).

Moreover, the process of DNA transformation mediated by OMVs seems to be a dose-independent process, since increasing the amount of OMVs does not increase the number of transformant colonies. Otherwise, and importantly, the OMV concentration found in culture supernatants is enough to mediate DNA transformation, making this process time dependent (Fig. 2). To explain this paradoxical result, it may be suggested that only a small proportion of the population of OMVs contain plasmids and that both types of OMVs (with and without plasmids) will compete to enter the bacterial host cell through specific points, or "hot spots," where OMVs merge, releasing the plasmid. This may explain that increasing the amount of OMV will also increase the proportion of OMVs without plasmids, and therefore, the rate of transformation efficiency will not be increased despite the increase of the number of OMVs. However, it seems clear that transformation through OMVs is a time-dependent process, as shown in Fig. 2, where the effectiveness of the process increases over time, reaching a plateau at approximately 24 h of incubation.

It is interesting that both plasmids pMMA2 and pMMCUC3 lack the Mob-like plasmid mobilization protein (GenBank ac-

cession numbers GQ377752 and GQ904227, respectively), suggesting that OMVs act as a likely alternative mechanism for mobilization plasmids lacking this protein, such as those harboring the *bla*<sub>OXA-24</sub> carbapenemase gene that we present here.

Carbapenems are so far the therapeutic alternatives of choice for the treatment of infections caused by *A. baumannii*. Considering that some nationwide multicenter studies from Spain have revealed that up to 43% of *A. baumannii* isolates are resistant to carbapenems (7) and that all 43% of these isolates carried *bla*<sub>OXA-24</sub> and 20% carried *bla*<sub>OXA-58</sub> (22), the notion that OMVs released by this microorganism may harbor plasmid-mediated carbapenemases is worrisome and emphasizes the need to adhere to strict infection control measures once such carbapenemase-producing *A. baumannii* isolates are detected in the hospital environment.

In summary, we present here experimental evidence showing that OMVs can spread carbapenem resistance genes in *A. baumannii* strains. This would be a new mechanism of dissemination of antibiotic resistance genes in addition to the previously known conjugation, transformation, and transduction processes.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Catalina Sueiro and Ada Castro for their kind help with microscopic techniques.

This work was supported by SERGAS grants (PS07/51 and PS07/90) and INCITE grant 08CSA064916PR from Xunta de Galicia, by Spanish Network for Research in Infectious Diseases grants RD06/0008/0011 and RD06/0008/0025, and by grants PI081613 and PS09/00687 from the Instituto de Salud Carlos III. Margarita Poza and Carlos Rumbo are recipients of an Isidro Parga Pondal research contract (Xunta de Galicia) and a scholarship from the Instituto de Salud Carlos III, respectively. Nelson C. Soares is a recipient of an Angeles Alvario research contract (Xunta de Galicia). Jose A. Mendez is supported by a Río Hortega research contract from the Instituto de Salud Carlos III.

#### REFERENCES

- Beveridge, T. J. 1999. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **181**:4725–4733.
- Bomberger, J. M., et al. 2009. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS Pathog.* **5**:e1000382.
- Bou, G., G. Cervero, M. A. Domínguez, C. Quereda, and J. Martínez-Beltrán. 2000. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* **6**:635–643.
- Bou, G., A. Oliver, and J. Martínez-Beltrán. 2000. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1556–1561.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254.
- Ciofu, O., T. J. Beveridge, J. Kadurugamuwa, J. Walther-Rasmussen, and N. Hoiby. 2000. Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:9–13.
- Cisneros, J. M., et al. 2005. Risk-factors for the acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain: a nationwide study. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**:874–879.
- Davis, J. M., H. M. Carvalho, S. B. Rasmussen, and A. D. O'Brien. 2006. Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis. *Infect. Immun.* **74**:4401–4408.
- Dorward, D. W., C. F. Garon, and R. C. Judd. 1989. Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **171**:2499–2505.
- Dubnau, D. 1999. DNA uptake in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**:217–244.
- Fernandez-Moreira, E., J. H. Helbig, and M. S. Swanson. 2006. Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes. *Infect. Immun.* **74**:3285–3295.
- Fiooca, R., et al. 1999. Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J. Pathol.* **188**:220–226.
- Kadurugamuwa, J. L., and T. J. Beveridge. 1995. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J. Bacteriol.* **177**:3998–4008.
- Klieve, A. V., et al. 2005. Naturally occurring DNA transfer system associated with membrane vesicles in cellulolytic *Ruminococcus* spp. of ruminal origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:4248–4253.
- Kolling, G. L., and K. R. Matthews. 1999. Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1843–1848.
- Kuehn, M. J., and N. C. Kesty. 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* **19**:2645–2655.
- Kwon, S. O., Y. S. Cho, J. C. Lee, and S. I. Kim. 2009. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol. Lett.* **297**:150–156.
- Mashburn, L. M., and M. Whiteley. 2005. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* **437**:422–425.
- Merino, M., et al. 2010. OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:2724–2727.
- Peleg, A. Y., H. Seifert, and D. L. Paterson. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**:538–582.
- Poirel, L., and P. Nordmann. 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:826–836.
- Ruiz, M., S. Marti, F. Fernandez-Cuenca, A. Pascual, and J. Vila. 2007. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**:1192–1198.
- Sabra, W., H. Lunsdorf, and A. P. Zeng. 2003. Alterations in the formation of lipopolysaccharide and membrane vesicles on the surface of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under oxygen stress conditions. *Microbiology* **149**:2789–2795.
- Smith, M. G., et al. 2007. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev.* **21**:601–614.
- Soares, N. C., et al. 2009. 2-DE analysis indicates that *Acinetobacter baumannii* displays a robust and versatile metabolism. *Proteome Sci.* **7**:37.
- Wai, S. N., et al. 2003. Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial CytA cytotoxin. *Cell* **115**:25–35.
- Yaron, S., G. L. Kolling, L. Simon, and K. R. Matthews. 2000. Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4414–4420.
- Yonezawa, H., et al. 2009. Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol.* **9**:197.





### **3.3. Artículo III: La porina Omp33-36 de *A. baumannii* es un factor de virulencia que induce apoptosis y modula la autofagia en células humanas**

La patogénesis bacteriana es definida por factores que favorecen la colonización (adhesión, motilidad y formación de biofilm), el desarrollo de la infección (citotoxicidad, inflamación, adquisición de hierro y resistencia al complemento del suero) y la persistencia en superficies, tanto vivas como inertes (resistencia a antibióticos, desinfectantes, resistencia a la desecación, uso de un amplio rango de sustratos para el crecimiento y formación de biofilm). En el artículo del que se ocupa este capítulo se estudió el papel de la proteína de membrana externa Omp33-36 (también denominada Omp34) en el desarrollo de citotoxicidad en diferentes tipos celulares, incluyendo células del sistema inmune y del tejido conectivo, y su relevancia en las infecciones causadas por *A. baumannii*.

Para estudiar la función de la proteína Omp33-36, se realizaron experimentos de expresión de la porina en oocitos de *Xenopus*, los cuales mostraron que funcionaba como un canal para el agua. Técnicas de dicroísmo circular confirmaron que su estructura secundaria era rica en barriles beta, al igual que se ha visto en otras porinas descritas previamente (193).

Para los estudios de citotoxicidad, la porina fue purificada. Para ello, Omp33-36 fue sobreexpresada en *E. coli* y purificada mediante 3 pasos de cromatografía, para ser finalmente concentrada en Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, y 0.06% LDAO. La ausencia de los contaminantes más probables (LPS y peptidoglicano (PGC)) fue confirmada mediante el uso de líneas celulares Hek293 transfectadas permanentemente con plásmidos que codifican para el receptor de tipo Toll 2 (reconoce PGC), y para el receptor de tipo Toll 4 (reconoce LPS) (194). La incubación de la Omp33-36 con ambas líneas celulares no produjo liberación de interleuquina-8 (IL-8), es decir, que la proteína estaba libre de ambos contaminantes.

Los ensayos realizados con la porina pura incubada con diferentes líneas celulares demostraron que ésta induce apoptosis en células eucariotas. La detección de este tipo de muerte celular fue llevada a cabo mediante diferentes técnicas. Células Hep-2 incubadas con 8  $\mu\text{g/mL}$  de Omp33-36 mostraron cambios morfológicos típicos de la apoptosis cuando eran observados con microscopía óptica: disminución del tamaño de las células, formación de ampollas en la membrana plasmática, pérdida de la forma celular y desprendimiento de la superficie de cultivo. Todos estos cambios no eran observados cuando las células eran previamente incubadas con el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK. Mediante microscopía de fluorescencia también se detectaron otras características apoptóticas en células Hep-2 cultivadas con la porina. Así, se detectó despolarización de las mitocondrias, disgregación del citoesqueleto, fragmentación del ADN y exposición externa de la fosfatidilserina en la membrana plasmática eucariota. Por otra parte, mediante citometría de flujo también se detectaron características apoptóticas en diferentes líneas celulares incubadas con la Omp33-36. Así, células Hep-2 y HeLa presentaban fragmentación de ADN cuando eran incubadas con la porina. Este efecto era revertido cuando las células eran estimuladas con la Omp33-36 previamente incubada con un anticuerpo policlonal anti-Omp33-36. Finalmente, mediante western blot se detectó la activación de la caspasa activadora 9 y de la caspasa efectora 3. Mediante MET se visualizaron en las células incubadas con la porina diferentes características, tanto apoptóticas (contracción del citoplasma, condensación del ADN y presencia de cuerpos apoptóticos) como autofágicas, apareciendo vacuolas de doble membrana a las 4 horas de incubación, cuyo número y tamaño iban aumentando a medida que se incrementaba el tiempo de exposición a la porina, llegándose a observar a las 12 y 20 horas vesículas multilamelares, indicativas de varios eventos de autofagia. Todos estos efectos no eran observados en las células no estimuladas.

Para asegurarse de que los efectos observados en las diferentes líneas celulares eran debidos a la proteína, y no a un posible contaminante, se clonó el gen *mapA* (*modulating autophagy protein from Acinetobacter*), que codifica para Omp33-36, en el vector eucariota inducible por doxiciclina pTRE2Hyg, el cual fue

transfectado en la línea celular HeLa Tet-On. Tras inducir con doxiciplina la producción de la porina en esta línea celular, se observaron diferentes características autofágicas. Mediante RT-PCR, se confirmó la expresión del gen *mapA*, así como un aumento del gen *p62*, marcador de autofagia, a lo largo del tiempo. Mediante western blot se detectó un aumento de la conversión de la proteína LC3B. Además, la observación mediante MET reveló en las células transfectadas la presencia de estructuras vesiculares de doble membrana, con contenido electrodensito en su interior, así como un gran número de estructuras membranosas repartidas por todo el citoplasma (probables fagóforos). Ninguno de estos efectos fue observado en el control negativo, para el cual se utilizó la línea HeLa Tet-On transfectada con el plásmido pTRE2Hyg vacío e inducido con doxiciplina.

Mediante western blot se observó que la incubación de fibroblastos salvajes (MEF<sup>WT</sup>) con 8 µg/mL de Omp33-36 producía un incremento de la caspasa 8 a lo largo del tiempo (activación de la apoptosis) y una acumulación de los marcadores autofágicos p62 y LC3B-II, esto último indicativo de un bloqueo en la autofagia. Para elucidar en que parte del proceso autofágico se producía este bloqueo, estos marcadores fueron estudiados con los inhibidores wortmanina (inhibidor de la PI3-quinasa, enzima necesaria para la formación del autofagosoma) y bafilomicina (inhibidor de la acidificación de los lisosomas, con lo que se inhibe la fusión autofagosoma-lisosoma) en ausencia y presencia de la porina. Las células incubadas con Omp33-36 y ambos inhibidores mostraron un comportamiento similar a las células incubadas únicamente con los inhibidores: en el caso de la wortmanina, no se formaban autofagosomas (se produce una acumulación de p62, pero no de LC3B-II), mientras que en presencia de bafilomicina se produce una acumulación de autofagosomas (se produce una acumulación de p62 y LC3B-II). Este último efecto es el mismo que se observa en las células eucariotas incubadas con la porina sola. Estos resultados, unidos a los obtenidos con las células HeLa transfectadas con *mapA* confirman que Omp33-36 produce un bloqueo de la autofagia con la consecuente acumulación de autofagosomas.

Para estudiar la relación entre apoptosis y autofagia se utilizaron líneas celulares defectivas para ambos procesos, concretamente, las líneas de fibroblastos de ratón MEF<sup>Bax<sup>-/-</sup>Bak<sup>-/-</sup></sup> (defectivas para apoptosis) y MEF<sup>atg5<sup>-/-</sup></sup> (defectivas para autofagia). Además, se utilizó el inhibidor químico de caspasas Z-VAD-FMK en MEF<sup>WT</sup> para estudiar el efecto de la inhibición de la apoptosis. Estas líneas fueron incubadas con 8 µg/mL de Omp33-36, y mediante western blot se estudiaron los marcadores de apoptosis caspasa 8, y LC3B-II y p62 para la autofagia. En la línea defectiva para apoptosis, y en la línea MEF<sup>WT</sup> previamente tratada con Z-VAD-FMK, se observó un incremento en la conversión de LC3B y degradación del p62, lo cual indica una activación del proceso de autofagia. Finalmente, cuando estos experimentos se realizaron con la línea defectiva para autofagia, la estimulación con Omp33-36 resultó en una activación similar de la caspasa 8 a la obtenida en el control, indicativo de la inducción de apoptosis.

La estimulación de macrófagos RAW264.7 con 8 µg/mL de Omp33-36 pura a lo largo del tiempo resultó en un incremento significativo de la producción de ROS, efecto que no se producía con el inhibidor NAC1. Mediante western blot se observó que, en presencia de Omp33-36, los marcadores caspasa-8, LC3B-II y p62 se comportaban de la misma forma con y sin NAC1, indicando esto que la inducción de apoptosis y la modulación de la autofagia se producen de igual manera, de forma que la producción de ROS se trataría de una consecuencia, y no de una causa, de ambos procesos.

Para responder si las OMVs en *A. baumannii* son un posible vehículo de transporte para Omp33-36, su presencia en las mismas se estudió de varias maneras. Por un lado, mediante western blot se detectó la presencia de la porina en las OMVs, y mediante MET e inmunohistoquímica, se visualizó la producción de OMVs por parte de *A. baumannii*, y que éstas contenían Omp33-36. El estudio en gel 2-DE de proteínas provenientes de OMVs, y su posterior identificación por MALDI TOF/TOF demostró que no solo Omp33-36 estaba presente, sino que había otras porinas, como por ejemplo la OmpA.

Por otra parte, se estudió la capacidad de las OMVs de *A. baumannii* de causar citotoxicidad en células eucariotas. Para ello, OMVs de *A. baumannii* ATCC 17978 y *A. baumannii* ATCC $\Delta$ *mapA* (mutante carente del gen *mapA*) fueron purificadas e incubadas con macrófagos RAW264.7, y los marcadores p62 y LC3B-II fueron estudiados. Los niveles de p62 fueron mucho más altos (casi ocho veces) en las células incubadas con OMVs pertenecientes a *A. baumannii* ATCC17978 que en la presencia de OMVs de *A. baumannii* ATCC $\Delta$ *mapA*. Los niveles de LC3B-II se incrementaron a lo largo del tiempo en ambos casos, indicando todo esto que las OMVs con Omp33-36 bloquean fuertemente la autofagia. De todas formas, existe un importante bloqueo en las células incubadas con OMVs sin Omp33-36, por lo que no se puede descartar la implicación de otras porinas, aunque en mucha menor medida que Omp33-36.

Se estudió la influencia de la Omp33-36 en la persistencia y supervivencia de la bacteria en el interior de macrófagos, de nuevo, utilizando las cepas *A. baumannii* ATCC 17978 y *A. baumannii* ATCC $\Delta$ *mapA*, que fueron incubadas con macrófagos RAW264.7 en una proporción de 20-50 bacterias por macrófago. Tras 16 horas de incubación, un significativo número de UFC/mL fueron recuperados de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 en comparación con la cepa mutante ( $35 \times 10^6$  y  $3 \times 10^6$  UFC respectivamente). La observación a través de MET permitió ver las bacterias de la cepa salvaje en el interior de autofagosomas vivas, lo cual es clave para el desarrollo de la infección.

Para conocer el impacto biológico de los resultados obtenidos, se determinó la virulencia en un modelo murino sistémico de infección. Los diez ratones infectados con  $3.5 \times 10^4$  UFC de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978, y uno de los diez ratones infectados con  $4 \times 10^4$  UFC de la cepa *A. baumannii* ATCC $\Delta$ *mapA* murieron en las primeras 18 horas de infección. El resto de los ratones murieron en las 6 horas siguientes. Estos resultados son indicativos de la implicación de Omp33-36 en la virulencia de *A. baumannii*.





## The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 Porin Is a Virulence Factor That Induces Apoptosis and Modulates Autophagy in Human Cells

Carlos Rumbo,<sup>a</sup> María Tomás,<sup>a</sup> Esteban Fernández Moreira,<sup>a</sup> Nelson Cruz Soares,<sup>a</sup> Micaela Carvajal,<sup>b</sup> Elena Santillana,<sup>c</sup> Alejandro Beceiro,<sup>a</sup> Antonio Romero,<sup>c</sup> Germán Bou<sup>a</sup>

Department of Microbiology, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña-INIBIC, La Coruña, Spain<sup>a</sup>; CEBAS-CSIC<sup>b</sup> and CIB-CSIC<sup>c</sup>, Madrid, Spain

*Acinetobacter baumannii* is an extracellular opportunistic human pathogen that is becoming increasingly problematic in hospitals. In the present study, we demonstrate that the *A. baumannii* Omp 33- to 36-kDa protein (Omp33-36) is a porin that acts as a channel for the passage of water. The protein is found on the cell surface and is released along with other porins in the outer membrane vesicles (OMVs). In immune and connective cell tissue, this protein induced apoptosis by activation of caspases and modulation of autophagy, with the consequent accumulation of p62/SQSTM1 (sequestosome 1) and LC3B-II (confirmed by use of autophagy inhibitors). Blockage of autophagy enables the bacterium to persist intracellularly (inside autophagosomes), with the subsequent development of cytotoxicity. Finally, we used macrophages and a mouse model of systemic infection to confirm that Omp33-36 is a virulence factor in *A. baumannii*. Overall, the study findings show that Omp33-36 plays an important role in the pathogenesis of *A. baumannii* infections.

Microbial pathogenesis is defined by factors that favor colonization (adhesion, motility, and biofilm formation), development of infection (cytotoxicity, inflammation, iron acquisition, and serum complement resistance), and persistence on either animate or inanimate surfaces (resistance to antibiotics, disinfectants, and desiccation; broad substrate utilization for growth; and biofilm formation). In relation to the development of infection, two mechanisms have been associated with intrinsic cellular defense: apoptosis and autophagy. Apoptosis is a process of programmed cell death that may be dependent on or independent of caspases. Caspases play a central role in the transduction of regulatory apoptotic signals (1). Autophagy involves cell degradation of the contents of lysosomal compartments associated with several proteins, for example, p62 and LC3B. p62 is an adapter protein that is selectively degraded by autophagy (2). This protein is known to accumulate when autophagy is inhibited (3). Likewise, when autophagy is activated, the levels of this protein decrease. LC3B is a protein that participates in maturation of the autophagosome, and it occurs in two forms: LC3B-I (cytosolic form) and LC3B-II (lipidated form and membrane-bound autophagosome).

*Acinetobacter baumannii* is an opportunistic, nonfermentative, nonflagellated Gram-negative bacillus that forms part of the normal flora of human skin, the gastrointestinal tract, and the upper respiratory tract. It is also common in soil and freshwater environments (4, 5). The bacterium has recently emerged to be an important nosocomial pathogen that causes pneumonia, septicemia, urinary tract infections, and meningitis (6). Consequently, it has been included in the Infectious Diseases Society of America (IDSA) hit list of the six most dangerous microbes (7). The cytotoxicity of *A. baumannii* has been ascribed to several proteins (8). These include two outer membrane proteins, the OmpA protein and the Omp 33- to 36-kDa protein (Omp33-36) (9, 10). However, thus far, the mechanism underlying the well-established relationship between the cytotoxicity induced by these outer membrane proteins and the development of apoptosis is not clear, and only OmpA has been studied (11, 12).

Omp33-36 (called Omp33 or Omp34 in some *Acinetobacter* spp.) expression is associated with resistance to carbapenem anti-

biotics (imipenem and meropenem). In a previous study in which our group cloned the gene encoding Omp33-36 of *A. baumannii*, here named the *mapA* (modulating autophagy protein from *Acinetobacter*) gene, we noted that the predicted amino acid sequence is typical of Gram-negative bacterial porins, although Omp33-36 is not very similar to other known outer membrane proteins (identity, 25 to 30%) (13).

The aim of the present study was to determine the role of Omp33-36 in the development of cytotoxicity (apoptosis and autophagy mechanisms) in several different cell types, including immune and connective tissue cells, and thus in *A. baumannii* infections.

### MATERIALS AND METHODS

**Characterization of Omp33-36 as a porin.** (i) **Expression of the *mapA* gene in *Xenopus* oocytes.** To express *mapA* (ENA accession number AJ831523) in *Xenopus* oocytes, the cDNA insert was excised with BamHI and ligated into *Xenopus* expression vectors. The mRNA was transcribed and capped using an *in vitro* transcription kit (Ambion T7 mMessage mMachine; AMS Biotechnology Ltd., Oxford, United Kingdom) according to the manufacturer's instructions.

*Xenopus* oocytes were prepared as previously described (14). Briefly, isolated oocytes were treated with collagenase, and after 24 h, healthy-looking stage V or VI oocytes were injected with either 50 nl mRNA (1  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ) or 50 nl diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated water. The oocyte swelling rate was determined as follows: after 3 days of incubation in ND96 [15 mM HEPES, pH 7.6, 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM

Received 12 May 2014. Returned for modification 2 June 2014.

Accepted 11 August 2014.

Published ahead of print 25 August 2014.

Editor: C. R. Roy.

Address correspondence to María Tomás, ma.del.mar.tomas.carmona@sergas.es, or Germán Bou, german.bou.avevalo@sergas.es.

C.R. and M.T. contributed equally to this article.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/IAI.02034-14



NaHCO<sub>3</sub>, 0.3 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.41 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.82 mM MgSO<sub>4</sub>] at 18°C, each oocyte was transferred into a 1:5 dilution of ND96. Changes in the cell volume were photographed with a digital camera, with images being recorded every 20 s to obtain 10 images in 2 min. The cell volume was calculated using the Sigmascan Pro (version 5) image analysis program (SPSS Inc.). The changes in protoplast volume over time were used to determine the exponential rate constant,  $k$ . The osmotic water permeability coefficient ( $P_f$ ) was calculated according to the following equation:  $(V_0/S_0)\{k/[V_w(\text{osmol}_{\text{in}} - \text{osmol}_{\text{out}})]\}$ , where  $V_0$  is the initial cell volume,  $S_0$  is the initial cell surface area,  $V_w$  is the molar volume of water (18 cm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>),  $k$  is the fitted exponential rate constant of the initial phase of the swelling, and  $\text{osmol}_{\text{in}}$  and  $\text{osmol}_{\text{out}}$  are the internal and external osmolarities, respectively.

To study porin functionality, 50  $\mu$ M mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>) was added to ND96 prior to  $P_f$  measurement, to block porin pore formation (15).

(ii) **Omp33-36 purification and analysis.** The *mapA* gene was PCR amplified from the genomic DNA of clinical strain *A. baumannii* JC7/04 (13). Primer design omitted the region corresponding to the peptide signal and was based on the sequence information available for *A. baumannii* *mapA* (GenBank accession number AJ831523). NcoI and HindIII sites were introduced through the primers at the 5' and 3' ends of the amplicon, respectively. A stop codon upstream from the HindIII site was incorporated in the reverse primer. The following primers were used: forward primer 5'-GGAGATTATcaaggCTCAATTTGAAGTTCCAAGGA-3' and reverse primer 5'-CGACGACCCAGaagcTAAGCTTTTATTAATGATGATGATGATGGAACGGAATTTAGCAT-3', where the lowercase italic sequences represent the NcoI and HindIII restriction endonuclease sites.

Amplified *mapA* was subsequently cloned into the NcoI and HindIII sites of the pRAT expression vector to yield the construct pRAT-His-*mapA* (pRAT-His33), which was confirmed by sequencing.

Bacterial cells were grown in Luria-Bertani (LB) broth containing 100 mg ampicillin liter<sup>-1</sup> at 37°C. Exponentially growing cultures (optical density at 600 nm [OD<sub>600</sub>] = 0.6 to 0.8) were induced with 0.5 mM IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside; Sigma, St. Louis, MO) and harvested by centrifugation after 12 h. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA) and lysed by sonication. Inclusion bodies were harvested by centrifugation at 17,000  $\times$  g for 20 min in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8, 500 mM KCl, 5 mM EDTA, 1% sodium deoxycholate, 1% lauryl sulfobetaine, and 1% Triton X-100, before being recentrifuged and washed several times with water to remove the detergent. The concentration of total Omp33-36 was measured by UV spectroscopy, and the protein was analyzed by SDS-PAGE.

Inclusion bodies of His-tagged Omp33-36 were solubilized in 5 M guanidinium chloride buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8. The protein was isolated by Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) affinity chromatography by means of an Akta purifier system (GE Healthcare) and Ni-NTA columns (HisTrap; HP Amersham Biosciences). The eluent consisted of a linear gradient of 0 to 500 mM imidazole in solubilization buffer. The resulting 25 ml of dilute protein solution was dialyzed overnight against 5 liters of water and centrifuged at 17,000  $\times$  g. The resulting pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 8, containing 5 M guanidinium chloride. Pooled fractions typically contained 2 mg protein/ml.

Edman degradation analysis of the N-terminal sequence was carried out with a Procise 494 analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The amino acid sequence of the N-terminal region of the 33- to 36-kDa polypeptide was as follows: Tyr-Gln-Phe-Glu-Val-Gln-Gly-Gln-Ser-Glu.

Refolding buffer (20 mM Tris hydrochloride [Tris-HCl], pH 8, 1 mM EDTA, 1% *N,N*-dimethyldodecylamine *N*-oxide [LDAO; Fluka, St. Louis, MO]) was cooled at 4°C for 30 min with stirring, after which Omp33-36 (2 mg/ml of solution buffer) was added and the mixture was quickly diluted 1:5 in a buffer containing 1% LDAO, 1 mM EDTA, and 20 mM Tris-HCl, pH 8. The protein solution was dialyzed against 5 liters of a buffer con-

taining 20 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, and 0.1% LDAO for 48 h at 4°C with two changes of the same buffer. The refolded protein (2 mg/ml) showed no signs of precipitation after 12 h.

Small aggregates and particulate matter were removed from the protein solution by ultracentrifugation at 17,000  $\times$  g for 30 min at 4°C. Omp33-36 was then further purified by ion-exchange chromatography and gel filtration chromatography. A fast-flow 5-ml Q-Sepharose column (HiTrap Q FF; Amersham Biosciences) was equilibrated with 3 bed volumes of binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% LDAO) and with 1 bed volume of elution buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 1 M NaCl, 0.06% LDAO). Omp33-36 was loaded onto the column at a flow rate of 2 ml/min and then purified with Q-Sepharose by using a linear gradient of 0 to 1 M NaCl in 20 mM Tris-HCl, pH 8, and 0.06% LDAO. The protein was concentrated by filtration through a Falcon 10-kDa-molecular-mass-cutoff membrane (Roche). For gel filtration chromatography, the Sephacryl S-300 (HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 high-resolution) column was equilibrated with 3 volumes of 20 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, and 0.06% LDAO. Omp33-36 was loaded and then eluted with the same buffer at a flow rate of 0.5 ml/min.

To study the secondary structure of Omp33-36, circular dichroism spectra were recorded in a Jasco J-810 spectropolarimeter (Jasco, Easton, MD) at ambient temperature. Omp33-36, at a concentration of 0.2 mg/ml in 20 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, and 0.06% LDAO, was placed in a quartz cuvette with a 0.2-cm path length.

To rule out the presence of potential bacterial contaminants, such as either peptidoglycan (PGC) or lipopolysaccharide (LPS), an assay was carried out using cell lines permanently expressing Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4, HEK293/TLR2 (human embryonic kidney 293 cells stably transfected with the human TLR2a gene) and HEK293/TLR4/MD2/CD14 (human embryonic kidney 293 cells stably transfected with TLR4a, MD2, and CD14 genes) cells, respectively (16) (Invitrogen, Toulouse, France). The cells were plated at a concentration of  $5 \times 10^5$  cells/well and exposed to 10  $\mu$ g Omp33-36/ml for 4 h. The negative control consisted of unstimulated cells. The positive controls were HEK293/TLR2 cells stimulated with 0.01, 1, or 10  $\mu$ g PGC (from *Bacillus subtilis*; Sigma-Aldrich)/ml or HEK293/TLR4/MD2/CD14 cells stimulated with 0.01, 1, or 10  $\mu$ g LPS (from *E. coli* O111:B4; Sigma-Aldrich)/ml. The interleukin-8 (IL-8) secreted into the medium by these cells in response to either stimulant was detected by a conventional enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; interleukin-8 high-sensitivity human ELISA set; ImmunoTools). The ELISA reaction was coupled to alkaline phosphatase, and the reaction product was detected at a wavelength of 405 nm in an ELISA reader (Lab Systems Multiscan Plus).

**Apoptosis in Omp33-36-treated cells.** (i) **Fluorescence microscopy studies of cell morphology and flow cytometry analysis of DNA fragmentation.** HEp-2 cells were seeded in a chamber slide (Lab-Tek, Rochester, NY) at a concentration of  $5 \times 10^4$  cells/well and treated with 8  $\mu$ g Omp33-36/ml for 4 or 12 h. To prevent apoptosis, 50 mM Z-VAD-FMK (BD Biosciences), a general caspase inhibitor, was added to the cells for 1 h. When required, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 15 min, washed twice with wash buffer (PBS and 0.05% Tween 20), permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 1 to 5 min, and finally, washed three times. In colocalization experiments, live mitochondria were stained with 10  $\mu$ g JC-1/ml and the J-9 mitochondrial potential sensor (Molecular Probes, Eugene, OR) for 30 min at 37°C before fixation. Staining with the F-actin probe fluorescein isothiocyanate (FITC)-phalloidin (Sigma) was performed following the manufacturer's recommendations. Phosphatidylserine flipping from the inner to the outer leaflet of the plasma membrane was assessed by *in vitro* binding of the FITC-coupled serum factor annexin V, as detected by fluorescence microscopy. Annexin V-FITC was added to cells seeded in a chamber slide, and the cells were treated with 8  $\mu$ g Omp33-36/ml for 4 and 12 h. After incubation for 15 min in the dark and one wash with PBS, the cells were counterstained with 1  $\mu$ g propidium iodide (PI)/ml to determine the fraction of permeable (necrotic) cells. The coverslips were



mounted with Ultracruz mounting medium, and the cells were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), which stains bacterial and eukaryotic DNA. The apoptotic index (percentage of apoptotic cells) was determined microscopically at 4 and 12 h by use of an Olympus BX61 fluorescence microscope and DP manager software.

To study DNA fragmentation, HEp-2 and HeLa cells were cultured in 6-well microtiter plates ( $5 \times 10^5$  cells/well) and challenged with 8  $\mu$ g Omp33-36/ml for 12 h. Untreated cells were used as the negative control. To ensure that Omp33-36 exposure was responsible for the observed fragmentation, the protein (8  $\mu$ g/ml) was incubated with the same volume of an undiluted rabbit polyclonal antibody against Omp33-36 for 1 h at 4°C. At the end of the incubation period, the protein that had been incubated with the polyclonal antibody was added to the cells. To exclude the possibility that the antibodies themselves had an effect on HEp-2 and HeLa cells, the same amount of antibody alone was added to the cultures; no effect on the cells was observed (data not shown). DNA fragmentation in HEp-2 and HeLa cells exposed to 8  $\mu$ g Omp33-36/ml for 12 h was determined with a modified terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay (APO-BrdU TUNEL assay kit), as described by the manufacturer (BD Pharmingen). Adherent cells (which were detached with trypsin) and detached cells were collected separately, and 20,000 cells per sample were assessed in a BD FACSCalibur flow cytometer.

**(ii) Caspase detection by immunoblotting.** The cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM NaF, 50 mM phosphate glycerol, protease inhibitor cocktail [Roche]) for 30 min on ice. The lysates were cleared by centrifugation and quantified in a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. Proteins from each sample were separated by SDS-PAGE on 12% acrylamide gels, followed by electrotransfer onto a polyvinylidene difluoride membrane (Roche). The blots were blocked in 5% nonfat skimmed milk and incubated with primary antibodies. Proteins were visualized using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, followed by enhanced chemiluminescence (ECL Plus kit; Amersham Pharmacia Biotech), and detected with a LAS3000 chemiluminescence detector (Fujifilm).

HEp-2 cells treated with Omp33-36 were incubated with primary antibodies against the following proteins, which were added to the medium at the concentrations recommended by the manufacturer: procaspase 3/caspase 3, procaspase 9/caspase 9 (BD Pharmingen), and tubulin (Sigma). The studies were conducted in three different experiments.

**Autophagy studies. (i) Electron microscopy analysis of alterations in cellular structures.** HEp-2 cells incubated for 4, 12, and 20 h with 8  $\mu$ g Omp33-36/ml were rinsed, detached, and centrifuged. The resulting pellets were immediately fixed in 2.5% cold glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4, for 4 h at room temperature and postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4, for 1 h at 4°C. The pellets were then dehydrated in a graded acetone series and embedded in Spurr medium. Semithin sections (1  $\mu$ m thick) were cut, stained with toluidine blue sodium tetraborate, and observed under a light microscope. Ultrathin sections (70 nm) obtained from the same specimens were stained with uranyl acetate and lead citrate and were observed by transmission electron microscopy (TEM; JEOL JEM 1010 microscope, 80 kV).

**(ii) Real-time PCR studies, immunoblotting, and electron microscopy analysis of the modulation of the autophagy in *mapA*-transfected HeLa Tet-On cells.** The *mapA* gene without a signal peptide was PCR amplified from the *A. baumannii* JC7/04 chromosome, using the primers CROmpFW (gcggcgcATGTATCAATTTGAAGTTCA) and CROmpRV (gtcgacTTAGAAACGGAATTTAGCATTTAA) (where the lowercase italic sequences represent the NotI and SalI restriction endonuclease sites), and cloned into pTRE2Hyg, a mammalian expression vector (Clontech). The resulting plasmids were purified with a High Pure plasmid isolation kit

(Roche). A Savant SpeedVac concentrator (SPD121P; Thermo Scientific) was used to obtain DNA of the appropriate concentration and purity.

A HeLa Tet-On Advanced (HTAC) cell line (Clontech) was transfected with pTRE2Hyg-*mapA* by using a FuGene HD transfection kit (Roche) following the manufacturer's instructions. Positive clones harboring pTRE2Hyg-*mapA* (HTAC-pTRE33Hyg cells) were obtained using the method described in the Tet-Off and Tet-On gene expression systems user manual (Clontech). Briefly, at 48 h posttransfection, 200  $\mu$ g/ml of hygromycin was added as a selective agent for the transfected cells; the medium was replaced every 4 days. After 3 weeks, hygromycin-resistant colonies were isolated and transferred to individual wells. As a negative control, the HeLa Tet-On cells were transfected with pTRE2Hyg as described above.

To produce a stably transfected cell line, all hygromycin-resistant colonies were induced with 1  $\mu$ g doxycycline/ml for 24, 48, and 72 h, and *mapA* gene expression was confirmed by real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR). DNase-treated RNA was obtained from  $10^6$  cells (0.4 to 0.6 absorbance units) by using a High Pure RNA isolation kit (Roche, Germany) and 100 ng of RNA per sample. Controls without reverse transcriptase confirmed the absence of contaminating DNA in the samples. For the RT-PCR studies, a LightCycler 480 RNA master hydrolysis probe (Roche, Germany) and UPL TaqMan probes (Roche, Germany) were used together with the following probes and primers, and the concentrations were adjusted to achieve efficiencies of 90 to 110%: for *mapA*, forward primer 5'-CAAGATGCTGTAAGTCTGCTACT-3', reverse primer 5'-CAATAGCCATGTTAGTGCCATC-3', and probe sequence 5'-TGGCAA CA-3' (number 145); for the  $\beta$ -actin gene, forward primer 5'-TCCTCCC TGGAGAAGAGCTAC-3', reverse primer 5'-GGCTGGAAGAGTGCCT CA-3', and probe sequence 5'-CAGGCAGC-3' (number 27).

Gene expression was normalized using the single-copy housekeeping gene  $\beta$ -actin and then calibrated relative to the expression of that gene, which was assigned a value of 1.0, in HTAC-pTRE33Hyg cells without induction. All experiments were performed in triplicate. The clone with the highest level of *mapA* expression was selected for the experiments. In the case of HeLa cells transfected with pTRE2Hyg, one hygromycin-resistant colony was selected at random for further experiments.

Studies of the expression of *p62* were carried out with the following probe and primers: probe sequence 5'-CTGCTGGG-3' (number 3), forward primer 5'-GGGCTGAAATGGCATGAG-3', and reverse primer 5'-GGCAAGGTCTCTGTGAGTAGG-3'.

As before, gene expression was normalized using the  $\beta$ -actin housekeeping gene and then calibrated relative to the expression of this gene, which was assigned a value of 1.0, in HTAC-pTRE2Hyg cells.

Cell death markers were assessed by immunoblotting *mapA*-transfected HeLa cells as described above. Anti-LC3B (Sigma) and a polyclonal antibody against Omp33-36 served as primary antibodies.

In TEM studies, HeLa cells transfected with pTRE2Hyg or pTRE2Hyg-*mapA* (HTAC-pTRE33Hyg cells) were induced with 1  $\mu$ g doxycycline/ml for 72 and 24 h, respectively. These cells were rinsed, detached, and harvested by centrifugation. The resulting pellets were fixed immediately, as described above, before being dehydrated. Semithin (1- $\mu$ m) sections were obtained and observed by light microscopy. In addition, ultrathin (70-nm) sections were prepared for TEM and analyzed using a JEOL JEM 1010 transmission electron microscope (80 kV).

**(iii) Immunoblot assays with autophagy inhibitors.** The p62, LC3B, and caspase 8 levels were studied in wild-type (wt) murine embryonic fibroblasts (MEFs) incubated with 8  $\mu$ g Omp33-36/ml. Moreover, p62 and LC3B levels were analyzed in combination with the autophagy inhibitors wortmannin (1  $\mu$ M; an inhibitor of the class III phosphatidylinositol 3-kinase [PI3K] activity) and bafilomycin (0.1  $\mu$ M; an inhibitor of the fusion between autophagosomes and lysosomes) for 0, 8, 16, and 24 h.

**Analysis of the relationship between apoptosis and autophagy. (i) Immunoblotting studies of apoptosis and autophagy.** Fibroblasts in which the *bax* and *bak* genes were knocked out (*bax*<sup>-/-</sup> *bak*<sup>-/-</sup> MEFs) (17) were incubated with 8  $\mu$ g Omp33-36/ml. The autophagy markers

p62 and LC3B were analyzed in immunoblots of the cells prepared after 0, 8, 16, and 24 h of treatment. In addition, wt MEFs were pretreated for 30 min with 5  $\mu$ M the apoptosis inhibitor Z-VAD-FMK and also incubated with 8  $\mu$ g Omp33-36/ml for 0, 8, 16, and 24 h.

p62, LC3B, and caspase 8 (apoptosis activity) markers were also analyzed in similarly treated autophagy-defective fibroblasts (*atg5*<sup>-/-</sup> MEFs).

**(ii) Apoptosis and modulation of autophagy in relation to the ROS response.** Cellular oxidative stress after Omp33-36 treatment was assessed using 10  $\mu$ M the reactive oxygen species (ROS)-sensitive probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; Fluka, St. Louis, MO). Briefly, RAW 264.7 cells were treated for 8, 16, and 24 h with 8  $\mu$ g Omp33-36/ml. Untreated cells and LDAO-treated cells were used as negative controls. Moreover, cells pretreated for 30 min with 20 mM N-acetyl-L-cysteine (NAC1; a chemical inhibitor of ROS; Sigma-Aldrich, Germany) and incubated with 8  $\mu$ g Omp33-36/ml for 24 h were used as controls. The cells were labeled with 10  $\mu$ M DCFH-DA in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) for 30 min and then treated again for 15 min either with 8  $\mu$ g Omp33-36/ml or, for the negative controls, with LDAO and 20 mM NAC1. The cells were then washed once with physiological saline solution, harvested, resuspended in PBS, and finally, visualized by flow cytometry analysis in the FL1 channel of a BD FACSCalibur system (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, USA). Fluorescence levels denoted the percentage of cells positive for ROS production. p62, LC3B, caspase 8, and GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Sigma) antibodies were analyzed in RAW 264.7 cells that had been pretreated for 30 min with 20 mM NAC1 and incubated with 8  $\mu$ g Omp33-36/ml for 0, 8, 16, and 24 h.

**Proteomic and immunoblotting analysis of OMVs carrying Omp33-36 in *A. baumannii* ATCC 17978 and *A. baumannii* ATCC $\Delta$ mapA.** A stable mutant carrying the *mapA* gene (locus tag A1S\_3297; ENA accession number AM039631) from the full genome of *A. baumannii* ATCC 17978 (*A. baumannii* ATCC $\Delta$ mapA) and free of foreign plasmid DNA was obtained by gene replacement via double-crossover recombination, confirmed by proteomic and immunoblotting analyses (18).

*A. baumannii* ATCC 17978 and *A. baumannii* ATCC $\Delta$ mapA were cultured in 1 liter of LB broth containing 500 mM NaCl (19), and outer membrane vesicles (OMVs) were extracted following the protocol described by Rumbo et al. (20).

The autophagic markers LC3B and p62 were analyzed in immunoblots of RAW 264.7 cells incubated with 50  $\mu$ g of OMVs from *A. baumannii* ATCC 17978 and *A. baumannii* ATCC $\Delta$ mapA strains for 0, 8, 16, and 24 h. Moreover, a polyclonal antibody against Omp33-36 was used to confirm the presence of the protein in OMVs from *A. baumannii* ATCC 17978.

To observe OMV release from both isolates by electron microscopy, the cells were prepared according to the above-described protocol.

Proteomics studies were carried out by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) of the OMVs to detect the presence of Omp33-36. The protein concentration in the extracts was determined by a modified Bradford assay, by using a protein assay kit (Bio-Rad, Germany). For isoelectric focusing, an IPGphor III system (Amersham GE Healthcare, USA) was used with 3-10 nonlinear immobilized pH gradient (IPG) strips (13 cm; GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Proteins were solubilized in 8 M urea, 2% (wt/vol) CHAPS {3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate}, 40 mM dithiothreitol (DTT), and 0.5% (vol/vol) IPG buffer (GE Healthcare). Isoelectric focusing was carried out at 30 V for 12 h, followed by 250 V for 1 h, 500 V for 1.5 h, 1,000 V for 1.5 h, a gradient to 8,000 V over 1.5 h, and maintenance at 8,000 V for a further 4 h. All steps were carried out at 20°C. Prior to the second dimension (SDS-PAGE), the focused IPG strips were equilibrated twice for 15 min each time in buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% (vol/vol) glycerol, and 2% (wt/vol) SDS. A trace of bromophenol blue-DTT (1%, wt/vol) was added to the mixture for the first equilibration step, and 2.5% (wt/vol) iodoacetamide was added to the mixture for the second equilibration step. SDS-PAGE was performed on 12% or 15% polyacrylamide gels. Analytical 2-DE gels were stained with silver nitrate, and the

gels were loaded with 25  $\mu$ g of total protein. For preparative gels, mass spectrometry-compatible silver staining, in which the gels were loaded with at least 150  $\mu$ g of total protein, was carried out. The gels were scanned with an image scanner (GE Healthcare, Biosciences), and the data were analyzed with Image Master Platinum software, v.6.0 (GE Healthcare, Biosciences). For matrix-assisted laser desorption/ionization–tandem time of flight (MALDI-TOF/TOF) mass spectrometry, the selected spots were excised from the gels and destained for 5 min with a solution containing 20% (wt/vol) sodium thiosulfate and 1% (wt/vol) potassium ferricyanide. The supernatant was removed and the gel spots were washed twice with 25 mM ammonium bicarbonate in 50% (vol/vol) acetonitrile for 20 min and then in acetonitrile, dried in a SpeedVac apparatus (Savant), and digested overnight with 20  $\mu$ g trypsin (Roche, USA)/ml in 25 mM ammonium bicarbonate at 37°C. When necessary, tryptic peptides were passed through C<sub>18</sub> Zip-Tip pipette tips (Millipore, USA), mixed with 3 mg  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid/ml (as the matrix) in 0.1% trifluoroacetic acid in 50% acetonitrile, and subjected to MALDI-TOF/TOF analysis (4800 proteomics analyzer; Applied Biosystems). For protein identification, databases (NCBItr) were queried with Mascot data files obtained from the MALDI-TOF/TOF mass spectral data. The Mascot scores for all protein identifications were higher than the accepted threshold of significance ( $P < 0.05$ ). In the case of the Mascot results, monoisotopic masses were used to search the databases, allowing a peptide mass accuracy of 0.6 Da and one partial cleavage. Methionine oxidation and carbamidomethyl modification of cysteine were considered.

**Electron microscopy of the bacteria and the autophagosome structure.** For TEM studies, RAW 264.7 macrophages were incubated for 12 h with *A. baumannii* ATCC 17978 cells and prepared as described above. Ultrathin sections (70 nm) were examined and photographed with a JEOL JEM 1010 transmission electron microscope (80 kV).

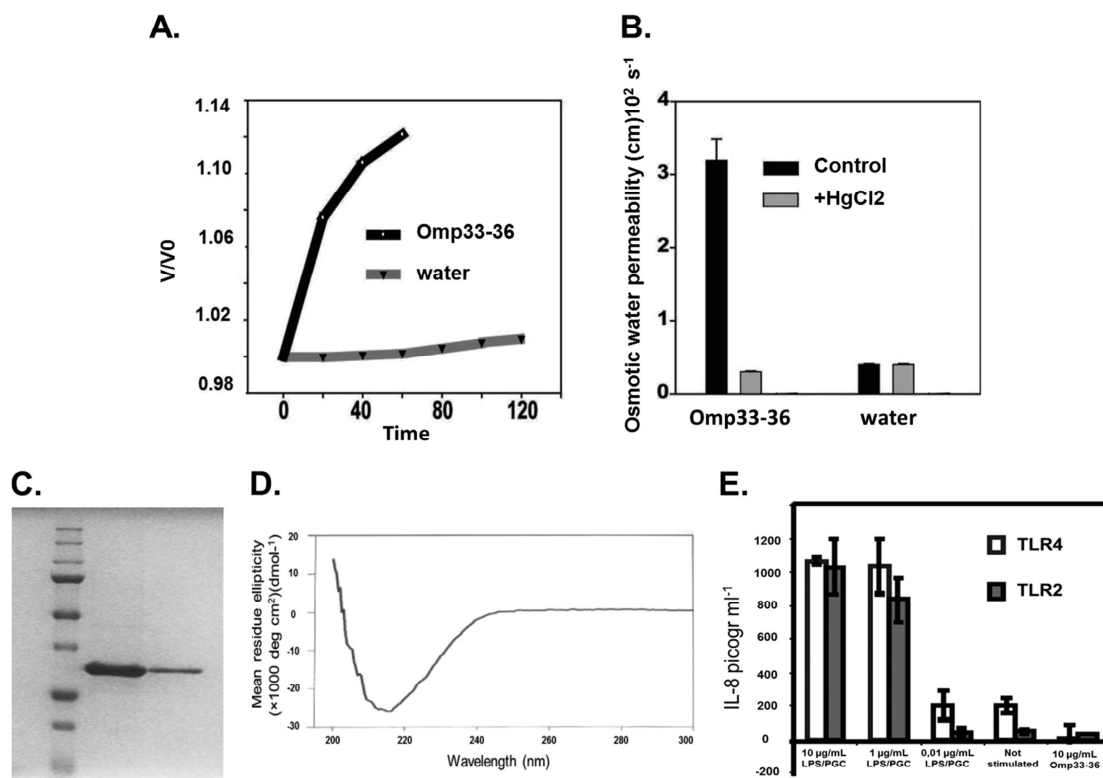
**Intracellular persistence of *A. baumannii* ATCC 17978 and ATCC $\Delta$ mapA strains and virulence in a mouse model of infection.** To assay survival within macrophages, 10<sup>6</sup> exponentially growing (OD<sub>600</sub> = 0.4 to 0.6) bacterial cells from *A. baumannii* strains ATCC 17978 and ATCC $\Delta$ mapA were collected and cultured with RAW 264.7 macrophages for 12 and 16 h in 6-well plates at a ratio of 20 to 50 bacteria per cell. The plates were then washed three times with serum, after which DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin, and 15  $\mu$ g colistin/ml was added to eliminate external bacteria. After incubation for 2 h, the macrophages were lysed with 1 ml of 0.5% deoxycholate and the lysates (6 wells/strain) were seeded onto LB plates.

Male BALB/c mice (age, 5 to 8 weeks; weight, approximately 20 g) were housed under specific-pathogen-free conditions with antibiotic-free pelleted food and autoclaved water provided *ad libitum*. All experiments involving mice were approved by the Animal Ethics Committee from an outside organization made up of institutions affiliated with this work.

*A. baumannii* strains ATCC 17978 and ATCC $\Delta$ mapA were analyzed for virulence by use of the model previously described by Smani et al. (10). Two groups of 10 mice each were infected intraperitoneally with 0.5 ml of a bacterial suspension containing 5% porcine mucin and either 3.5  $\times$  10<sup>4</sup> CFU of *A. baumannii* strain ATCC 17978 or 4  $\times$  10<sup>4</sup> CFU of *A. baumannii* strain ATCC $\Delta$ mapA and monitored for signs of disease over 7 days. Each strain was grown for 18 h at 37°C in LB broth, and the number of cells was adjusted to the appropriate concentration with physiological saline. Inocula were prepared by mixing the bacterial suspensions 1:1 (vol/vol) with a 10% (wt/vol) solution of porcine mucin (Sigma). The bacterial concentrations of the inocula were determined by plating on LB agar. Survival data were compared using the log-rank test, and differences with a  $P$  value of <0.0001 were considered statistically significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Omp33-36 is a porin. (i) Expression of Omp33-36 in *Xenopus* oocytes.** To assess whether Omp33-36 acts as an outer membrane channel, we expressed its cRNA in *Xenopus* oocytes and then determined the permeability ( $P_f$ ) of the cells to water (Fig. 1A and B).



**FIG 1** (A) Omp33-36 acts as a channel (porin) for the passage of water. The x axis shows the time course of osmotic swelling of individual *Xenopus* oocytes injected with water or the cRNA of Omp33-36 from *A. baumannii*. Oocytes in ND96 were perfused at time zero with a 5-fold dilution of ND96 in distilled water. On the y axis,  $V_0$  is the initial cell volume and  $V$  is the cell volume after treatment. (B) The porin is an aquaporin. The osmotic permeability ( $P_f$ ) to water of individual oocytes injected with water or the cRNA of Omp33-36 from *A. baumannii* (bars labeled Omp33-36) was determined. Oocytes in ND96 were perfused at time zero with a 5-fold dilution of ND96 in distilled water (bars labeled water). The  $P_f$  values reflect the volume changes determined in three different oocytes. When indicated, the inhibition assay was performed in the presence of mercury ( $50 \mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ , 10 min preincubation) dissolved in the same distilled water used for diluting ND96. (C) Purification of Omp33-36. A Coomassie blue-stained gel of purified Omp33-36 from *A. baumannii* is shown. SDS-PAGE on a 12% acrylamide gel did not reveal any bacterial contaminants in  $16 \mu\text{g}$  of purified Omp33-36. (D)  $\beta$ -Barrels as a secondary structural feature of the porin. The circular dichroism spectrum of Omp33-36 in Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, and 0.06% LDAO is shown. The Omp33-36-LDAO spectrum revealed  $\beta$ -barrels as the secondary structure. (E) Absence of contaminants in Omp33-36. The results of the IL-8 ELISA performed with the culture medium of HEK293/TLR4 cells stimulated for 4 h with 10, 1, or 0.01  $\mu\text{g}$  of *E. coli* LPS/ml, not stimulated, or stimulated with 10  $\mu\text{g}$  pure Omp33-36/ml are shown. HEK293/TLR2 cells were challenged in the same way, except that commercial peptidoglycan was used. Pure Omp33-36 did not contain any bacterial contaminants that triggered TLR2 or TLR4 activation.

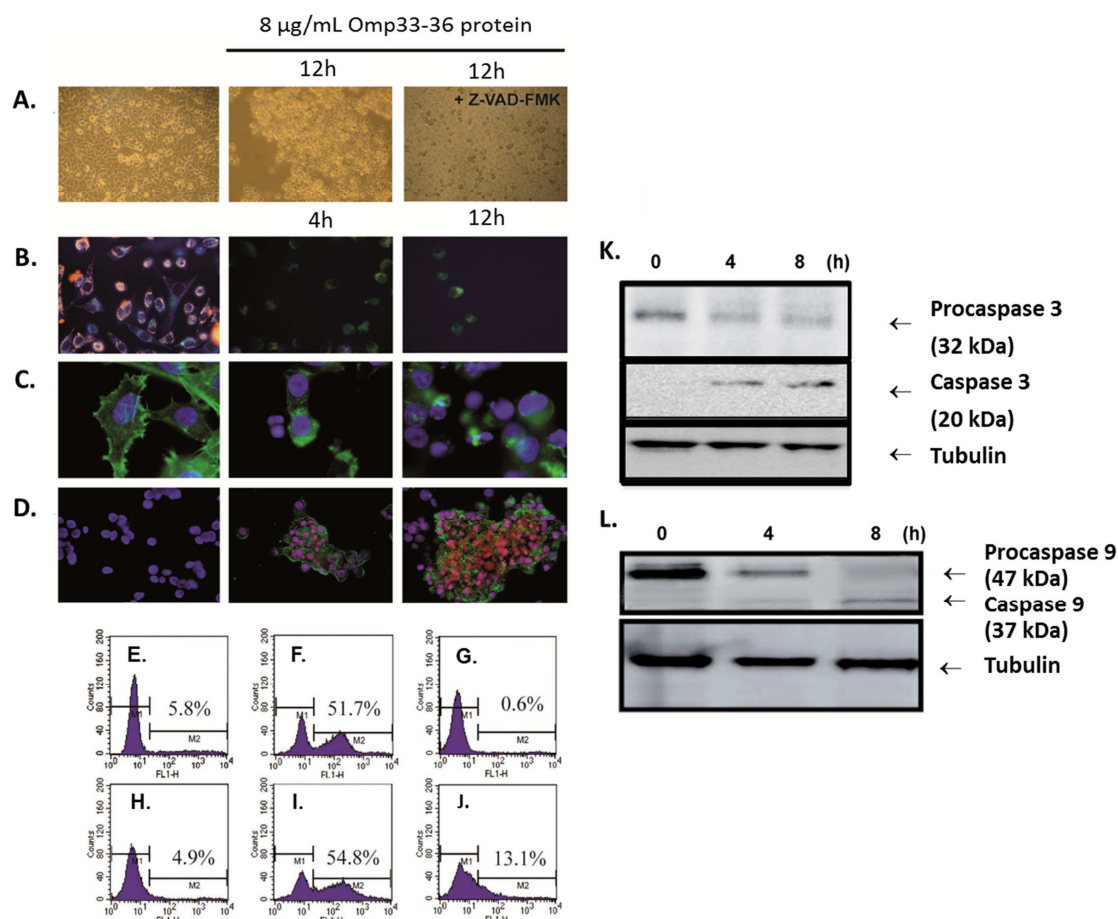
The values for the  $P_f$  of oocytes expressing Omp33-36 to water were higher than those of control oocytes (Fig. 1A), suggesting that Omp33-36 permits the passage of water and is thus similar to a porin. Outer membrane proteins that form water channels are functionally inhibited by mercurial compounds (21, 22). Thus, the addition of  $50 \mu\text{M}$  mercuric chloride strongly inhibited Omp33-36, reducing the  $P_f$  of oocytes expressing Omp33-36 to water to that of control oocytes (Fig. 1B). These results confirm that Omp33-36 acts as a porin that allows the passage of water in *A. baumannii*.

**(ii) Purification of *A. baumannii* Omp33-36 and the  $\beta$ -barrel structure of the protein.** Omp33-36 was overproduced in *E. coli* cells, then purified first on a Ni-NTA affinity column and then by ion-exchange and size exclusion chromatography, and finally, concentrated in Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, and 0.06% LDAO. The

aim of this three-step purification protocol was to remove any bacterial contaminants that may have coeluted with the protein (Fig. 1C), especially major components of the bacterial membrane.

The circular dichroism spectrum of purified Omp33-36 (Fig. 1D) was consistent with a secondary structure rich in  $\beta$ -barrels, which are also a major feature of other bacterial porins (22).

To confirm that purified Omp33-36 induces cytotoxicity in human cells, it was first necessary to rule out the presence of bacterial contaminants, such as LPS and PGCs, which may have coeluted with the protein during the purification process. The toxic effects of LPS and PGCs are mediated by specific Toll-like receptors, which in turn stimulate interleukin-8 (IL-8) secretion (23, 24). Accordingly, we measured IL-8 release from HEK293 cells permanently transfected with a plasmid encoding either the PGC receptor Toll-like receptor 2 (TLR2) or the LPS receptor Toll-like



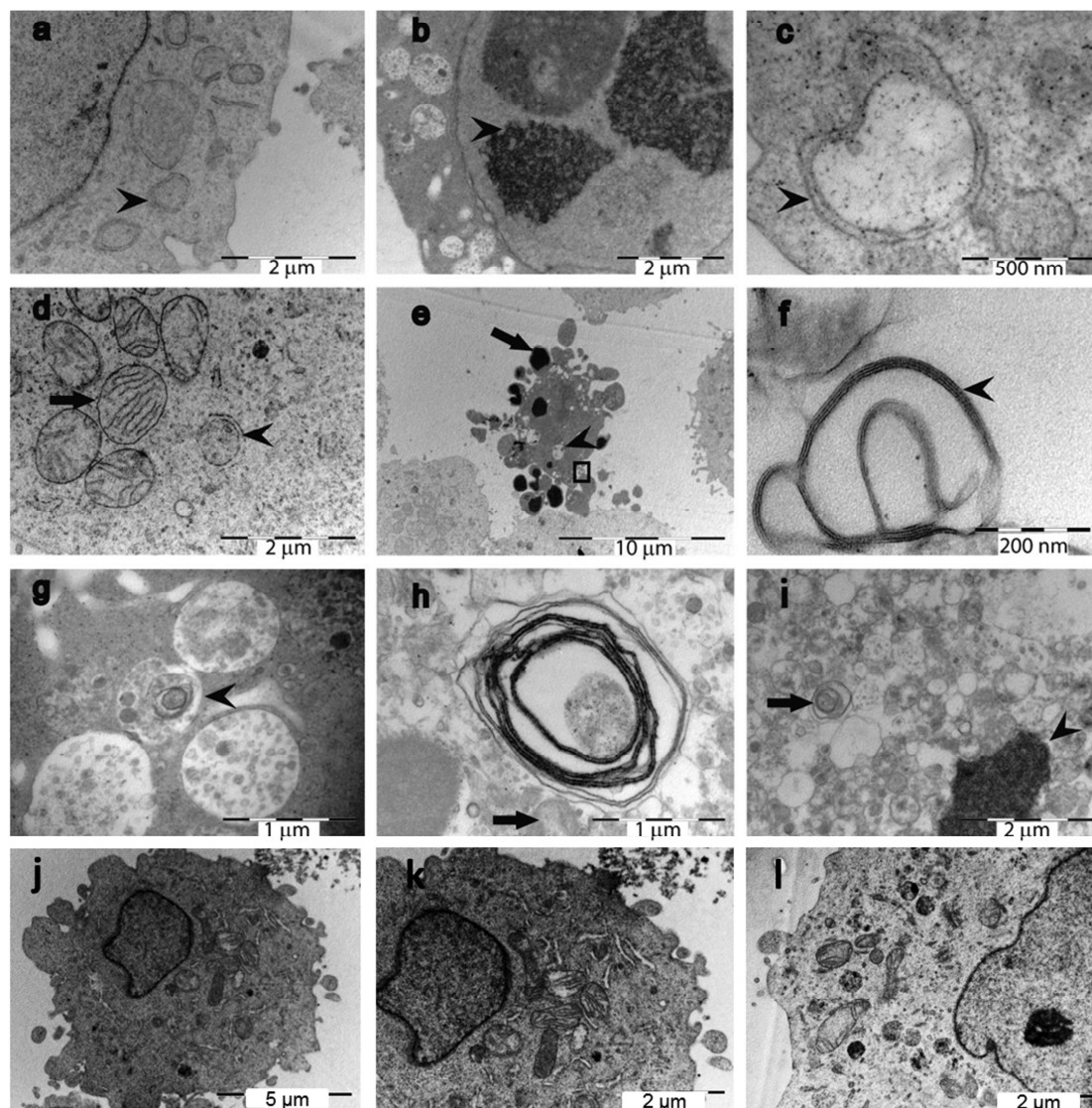
**FIG 2** (A) Morphological changes indicative of apoptosis by bright-field microscopy. The changes in HEp-2 cells incubated with 8  $\mu$ g/ml of Omp33-36 for 12 h (center and right) and in the absence of this protein (left) are shown. The cells were pretreated for 1 h with 5  $\mu$ M the caspase inhibitor Z-VAD-FMK (right). Magnifications,  $\times 20$ . (B to D) Apoptotic features analyzed by fluorescence microscopy. (B) Untreated cells accumulated JC-1 (red) in polarized mitochondria (left). In cells incubated with Omp33-36 for 4 h (center) or 12 h (right), the green monomeric form of JC-1 accumulated throughout the cytoplasm (both images, center and right). Magnifications,  $\times 40$ . (C) Costaining of the cytoskeleton with phalloidin and of nuclear DNA with DAPI. Round nuclei and a structured cytoskeleton are evident in untreated cells (left), whereas cells incubated with Omp33-36 for 4 h (center) or 12 h (right) show a collapsed cytoskeleton and apoptotic bodies. Magnifications,  $\times 100$ . (D) Treated cells were stained with DAPI, PI, and annexin V, and untreated cells were treated with DAPI only. Cells incubated with Omp33-36 for 4 h (center) and 12 h (right) were stained with annexin V and in some cases with PI, which specifically stains fragmented DNA. Magnifications,  $\times 40$ . The images are representative of those from three independent experiments, in which at least 50 cells were scored each time. (E to J) Flow cytometric analysis of apoptosis by staining by use of an APO-BrdU kit (TUNEL assay). HEp-2 cells (E to G) and HeLa cells (H to J) were seeded at a density of  $5 \times 10^5$  cells and were then either challenged with 8  $\mu$ g Omp33-36/ml (F, G, I, J) shortly thereafter or left untreated (E, H). To block Omp33-36, the cells were incubated for 1 h at 4°C with excess anti-Omp33-36 antibody, which was added to the cultures together with Omp33-36 (G, J). After 12 h, the cells were harvested and analyzed for apoptosis, as described in Materials and Methods. (K, L) Caspase cleavage during Omp33-36-induced apoptosis. HEp-2 cells were challenged at different times with 8  $\mu$ g Omp33-36/ml. Cell lysates were resolved by SDS-PAGE on 12% gels and immunoblotted with specific antibodies. Tubulin served as a loading control. (K) Lysates prepared from HEp-2 cells exposed to 8  $\mu$ g/ml of Omp33-36 for 4, 8, and 12 h were blotted against procaspase 3 and caspase 3. (L) Lysates prepared from HEp-2 cells exposed to 8  $\mu$ g/ml of Omp33-36 for 4 and 8 h were blotted against procaspase 9 and caspase 9.

receptor 4 (TLR4) (16) and stimulated with purified Omp33-36. Omp33-36 did not induce the release of IL-8 into the medium in either cell line, as the results were the same as those obtained with the negative noninduced controls (Fig. 1E). Moreover, when HEK293/TLR2 and HEK293/TLR4 cells were stimulated with LPS and PGCs at concentrations as low as 1  $\mu$ g/ml, the levels of IL-8

released were higher than the those released by cells in which IL-8 release was induced by the presence of Omp33-36 ( $P < 0.001$ ). We therefore concluded that the Omp33-36 preparation was free of bacterial contaminants.

Porins are fundamental for bacterial survival, mediating the diffusion of nutrients into the cell and toxic metabolites out of

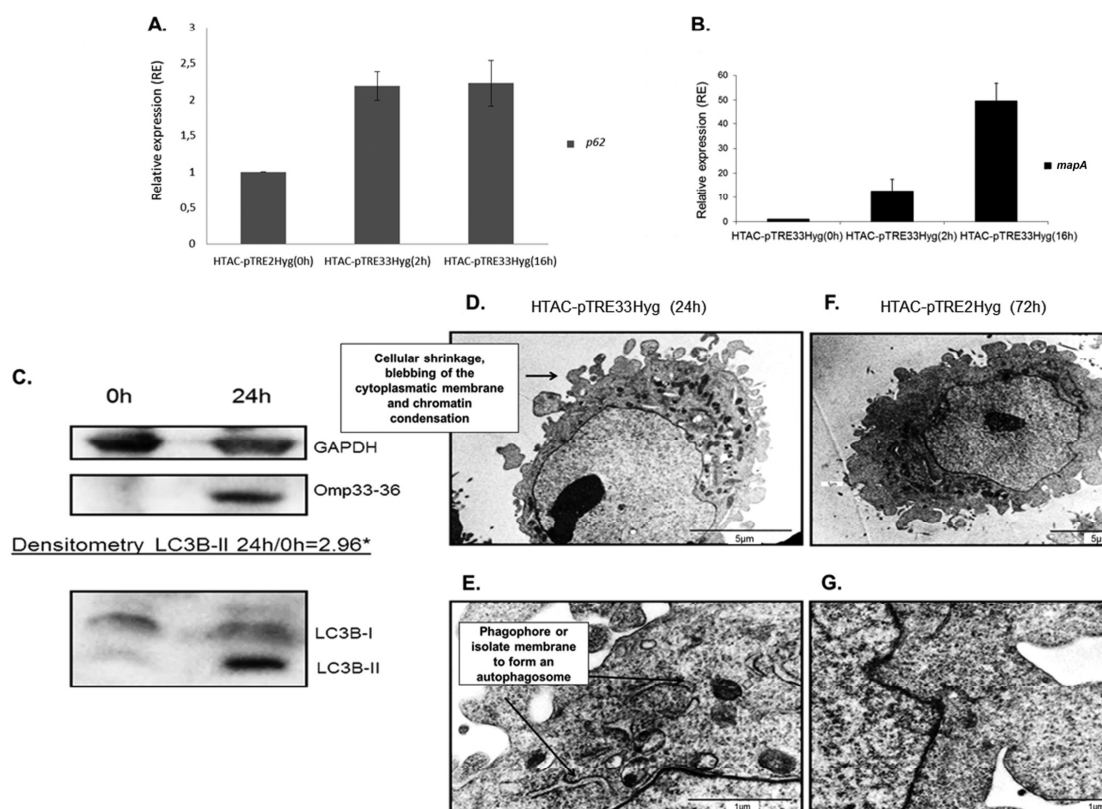




**FIG 3** TEM analysis of Omp33-36-treated HEP-2 cells reveals signs of apoptosis and autophagocytosis. The cells were incubated for 4 h (a, b), 12 h (c to g), and 20 h (h, i) with 8  $\mu$ g Omp33-36/ml or left untreated (j to l). (a) Double-membrane organelles (arrowhead), a “gold standard” biomarker of autophagy; (b) cytoplasmic content in vacuoles and condensed DNA (arrowhead); (c) double-membrane vacuole (arrowhead); (d) an organelle with a double membrane (arrowhead) surrounded by intact mitochondria with cristae (arrow); (e) a typical apoptotic cell with apoptotic bodies (arrow) and vesicles containing intracellular material (arrowhead); the area inside the square is amplified in panel f; (f) multilamellar organelle composed of a series of closely apposed membranes (arrowhead); (g) presumably damaged organelles (arrowhead) typical of multilamellar structures; (h) vesicular structure with an onion-ring-like appearance (arrow); (i) after 20 h, most of the cytoplasm is filled with cytoplasm-containing vacuoles (arrow) and the DNA is condensed (arrowhead); (j) a healthy HEP-2 cell; its cytoplasm is amplified in panel k; (k) intact mitochondria with cristae; (l) at 20 h, cytoplasm of an untreated HEP-2 cell showing healthy organelles.

the cell. Our findings are consistent with those of Smani et al. (10), who reported that the loss of Omp33-36 was associated with decreased fitness in *A. baumannii*, probably because of reduced nutrient intake.

**Omp33-36 induces apoptosis in human cells. (i) Omp33-36 produces apoptotic morphological changes in human cells.** Apoptosis, or programmed cell death, differs from necrosis in that it is associated with the appearance of specific morphological features:

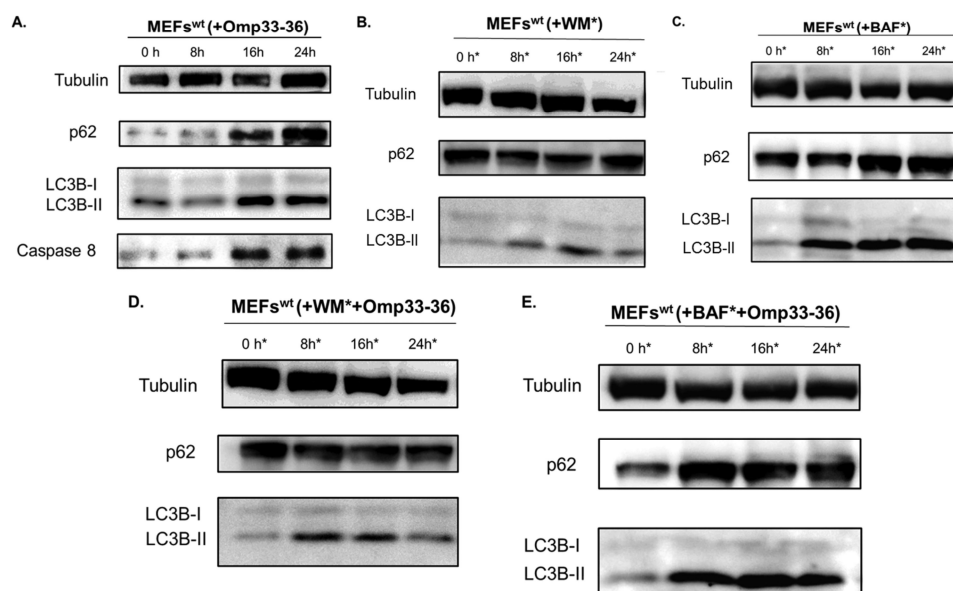


**FIG 4** (A, B) Modulation of autophagy was analyzed by RT-PCR in HeLa Tet-On Advanced (HTAC) cells transfected with *mapA* cloned in pTRE2Hyg (HTAC-pTRE33Hyg cells). *p62* gene expression was studied by RT-PCR at 2 h and 16 h after doxycycline induction of HTAC-pTRE33Hyg cells. Relative expression was based on HTAC-pTRE2Hyg expression (y axis) at 16 h, which was assigned a value of 1. The same samples were analyzed for *mapA* expression by HTAC-pTRE33Hyg cells at 0 h, 2 h, and 16 h after doxycycline induction. (C) Detection of Omp33-36 and LC3B accumulation in HTAC-pTRE33Hyg cells by immunoblotting for the detection of Omp33-36 and LC3B-I/LC3B-II by polyclonal antibodies in HTAC-pTRE33Hyg cells under the control of a doxycycline-inducible promoter. \*, densitometry of LC3B-II 0 and 24 h after doxycycline induction of HTAC-pTRE33Hyg cells. (D, E) Presence of the features of apoptosis and probable phagophore structures (isolate membrane to form an autophagosome) determined by TEM of HTAC-pTRE33Hyg cells expressing *mapA* after 24 h of doxycycline induction. (F, G) Absence of characteristics of the apoptosis and autophagy mechanisms determined by TEM of HTAC cells transfected with pTRE2Hyg (empty plasmid) after 72 h of doxycycline induction (negative control).

cellular shrinkage, blebbing of the cytoplasmic membrane, chromatin condensation, nuclear fragmentation, and DNA cleavage (Fig. 2A). To determine whether Omp33-36 induces apoptosis in human cells, we challenged a healthy population of HEP-2 human epithelial cells for 12 h (Fig. 2A, center) with a concentration of purified Omp33-36 equal to that used by Choi and colleagues in experiments in which apoptosis was induced by the porin OmpA (11). We observed cellular shrinkage, membrane blebbing, and rounded cells that detached from the culture plate, as reported by Choi et al. (11) for *A. baumannii* OmpA. These morphological changes were reversed by the addition to the culture of 5 µM Z-VAD-FMK, which inhibits apoptosis induced by diverse stimuli (Fig. 2A, right).

Changes in mitochondrial permeability (Fig. 2B), induced by loss of the electrochemical gradient across the mitochondrial membrane, are an early feature of apoptosis. In the mitochondria of healthy cells, the dye JC-1 is seen as fluorescent red aggregates (Fig. 2B, left). With the onset of apoptosis, the mitochondrial membrane potential is lost

and JC-1 no longer accumulates in the mitochondria, remaining in the cytoplasm as green fluorescent monomers (Fig. 2B, center and right). The cytoskeleton of the studied cells was stained with FITC-phalloidin, and the nuclear DNA was stained with DAPI (Fig. 2C). In HEP-2 cells exposed to Omp33-36, there was a clear loss of cytoskeletal structure, accompanied by cytoplasmic retraction (Fig. 2C, center and right). We also followed Omp33-36-induced apoptosis in HEP-2 cells by staining them with DAPI, PI, and annexin V (Fig. 2D). PI stains fragmented DNA, a characteristic feature of apoptosis, and annexin V binds to phosphatidylserine, present on the surface of apoptotic cells. HEP-2 cells incubated with Omp33-36 were positive (green) for annexin V (Fig. 2D, center and right), and the colocalization of PI (red) with DAPI (blue) within their apoptotic nuclei resulted in a pink coloration. These pink nuclei were also smaller than those that were positive only for DAPI. After incubation of the cells for 8 h with Omp33-36, the apoptotic index increased by 43% ( $P < 0.001$ , Mann-Whitney U-test).



**FIG 5** (A) Accumulation of autophagy markers (modulation of the autophagy) in the presence of Omp33-36. The accumulation of p62, LC3B, and caspase 8 was analyzed by Western blotting in wt MEFs. Cells incubated with 8  $\mu$ g/ml of Omp33-36 were tested at 0, 8, 16, and 24 h. (B, D) Inhibition of autophagy before formation of autophagosomes. Immunoblotting was performed to determine the levels of p62 and LC3B in wt MEFs in the presence of 1  $\mu$ M wortmannin (WM), which was added at 0, 8, 16, and 24 h (\*), in the presence and absence of 8  $\mu$ g/ml of Omp33-36. (C, E) Inhibition of autophagy and accumulation of autophagosomes. Western blotting was used to study the autophagy process by determining p62 and LC3B levels in the presence of 0.1  $\mu$ M baflomycin (BAF), which was added at 0, 8, 16, and 24 h (\*), in the presence and absence of 8  $\mu$ g/ml of Omp33-36.

All of these results suggest that apoptosis can be induced by *A. baumannii* Omp33-36 in human cells.

(ii) **DNA fragmentation induced by Omp33-36 in HeLa and HEp-2 cells is inhibited by anti-Omp33-36 antibody.** In HEp-2 and HeLa cells exposed to Omp33-36, DNA fragmentation was detected by use of an APO-BrdU kit (as described in Materials and Methods) in 51.7% (Fig. 2F) and 54.8% (Fig. 2I) of the cells, respectively. Preincubation of Omp33-36 with a polyclonal antibody against the protein for 1 h prevented DNA fragmentation (0.6% and 13.1%; Fig. 2G and J, respectively). To discount the possibility that the antibodies themselves have an effect on HEp-2 and HeLa cells, the same amount of antibody was added to the cultures and was found to have no effect on the cells at all (data not shown).

(iii) **Omp33-36 activates caspases in HEp-2 cells (Fig. 2K and L).** A group of intracellular proteases called caspases is responsible for the deliberate disassembly of the cell into apoptotic bodies during apoptosis (1). Caspases are present as inactive proenzymes that are activated by proteolytic cleavage. Caspases 9 and 3 are situated at pivotal junctions in apoptosis pathways. HEp-2 cells challenged with 8  $\mu$ g/ml of Omp33-36 displayed caspase activation. Specifically, we observed a decrease in the amount of procaspase 3 (at 4 and 8 h) and an increase in its active form, caspase 3. The same transformation was observed for procaspase 9 and its active form, caspase 9.

The activation of proapoptotic proteins of the Bcl-2 family causes mitochondrial damage, which leads to the release of cytochrome c into the cytoplasm and, thus, to apoptosome activation,

so that caspase 9 is cleaved from its inactive procaspase 9 state (47 kDa) to its active form (37 kDa). Activated caspase 9 (Fig. 2L) in turn activates caspase 3 (Fig. 2K), triggering the final phases of the apoptosis cascade.

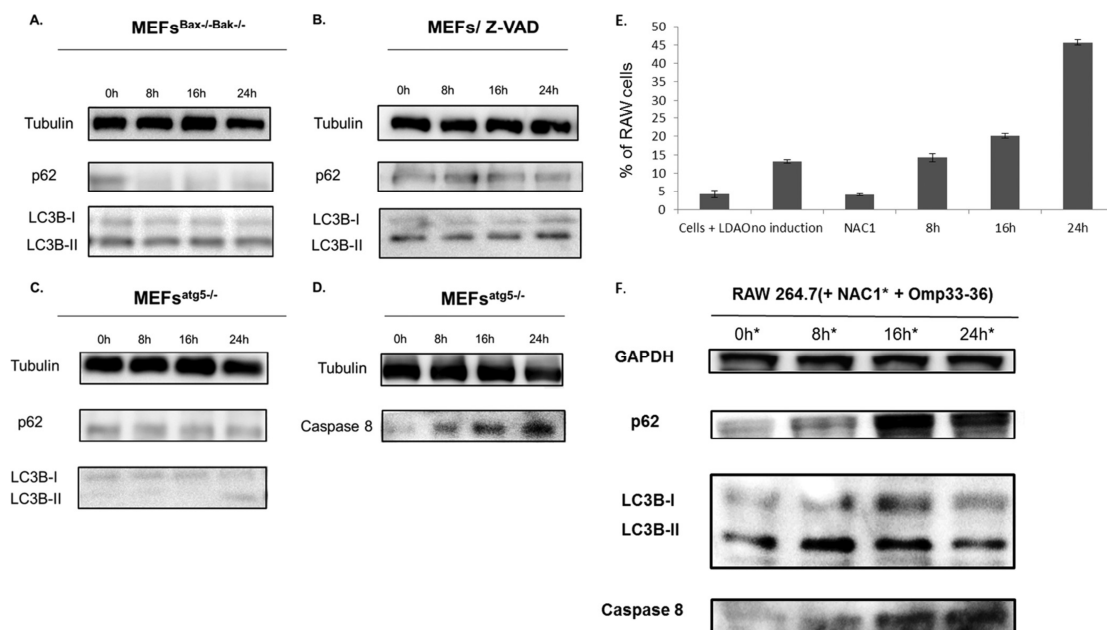
The involvement of bacterial porins in the development of apoptosis is known for several pathogens (25), but as noted in the introduction, only the 38- to 40-kDa Omp protein (OmpA) has been implicated in this process in *A. baumannii* (9, 11). However, OmpA differs from Omp33-36 in that although the former causes cytotoxicity by targeting the host cell through a specific nuclear localization signal region (KTKEGRAMNRR), this motif is lacking in Omp33-36 (26).

#### Involvement of Omp33-36 in the modulation of autophagy.

(i) **Structures derived from processes of apoptosis and autophagy are present in HEp-2 cells incubated with Omp33-36 (Fig. 3).** Electron microscopic analysis showed that while unstimulated HEp-2 cells showed a healthy cell morphology (the presence of a nucleolus, uncondensed DNA, cytoplasmic organelles, mitochondria with cristae), cells incubated for 4, 12, or 20 h with 8  $\mu$ g Omp33-36/ml revealed a significant increase in the number of apoptotic cells (Fig. 3) with a shrunken cytoplasm exhibiting DNA condensation and apoptotic bodies, as well as double-membrane organelles and onion ring-like multilamellar bodies as markers of autophagy (Fig. 3). This indicates that the protein is involved in apoptosis and autophagy.

(ii) **Transfection of *mapA* gene in HeLa Tet-On cells and modulation of autophagy.** To confirm the results obtained with purified Omp33-36 and to fully rule out the putative effect of





**FIG 6** (A, B) Activation of the autophagy mechanism occurs without development of apoptosis. Western blotting was used to study the autophagy markers p62 and LC3B in cells defective for apoptosis (*bax*<sup>-/-</sup> *bak*<sup>-/-</sup> MEFs [MEFs<sup>Bax<sup>-/-</sup> Bak<sup>-/-</sup></sup>] and wt MEFs pretreated with 5  $\mu$ M Z-VAD [MEFs/Z-VAD]). The cells were incubated with 8  $\mu$ g/ml of Omp33-36 for 0, 8, 16, and 24 h. (C, D) Apoptosis occurs without autophagy. Western blotting was used to analyze the autophagy markers (p62 and LC3B) and apoptosis antibodies (caspase 8) in defective autophagic cells (*atg5*<sup>-/-</sup> MEFs). Cells were also incubated with 8  $\mu$ g/ml of Omp33-36 for 0, 8, 16, and 24 h. (E) Time course of ROS production by cells subjected to oxidative stress (indicated as the percentage of RAW 264.7 cells) after incubation with Omp33-36 (8, 16, and 24 h). Negative controls: cells + LDAO, Omp33-36 buffer solution; no induction, cells alone; and NAC1, cells plus 20 mM NAC1. All negative-control experiments were done at 24 h. There was a significant increase ( $P < 0.001$ , Mann-Whitney U test) in ROS production over time in the presence of Omp33-36. (F) Inhibition of ROS response as consequence of apoptosis and blockage of autophagy. An immunoblot with anti-LC3B, anti-p62, and anti-caspase 8 antibodies in RAW 264.7 cells treated for 30 min with 20 mM NAC1 and 8  $\mu$ g Omp33-36/ml at 0, 8, 16, and 24 h is shown.

bacterial contaminants, the *mapA* gene under the control of a doxycycline-inducible promoter was cloned into a eukaryotic vector that was then used to transfect HeLa Tet-On Advanced cells (HTAC-pTRE33Hyg cells). The relative expression of the *p62* and *mapA* genes in *mapA* transfectants induced with doxycycline for 2 and 16 h was determined (Fig. 4A and B). The *p62* marker was induced at 2 to 16 h, which indicates blockage of autophagy.

Induction of *mapA* expression by incubation of the transfectants with doxycycline for 24 h was followed by monitoring of the increase in the autophagy marker LC3B-II (Fig. 4C), as revealed by Western blotting and densitometry analysis. Electron microscopy revealed a membranous cistern from the endoplasmic reticulum (a probable phagophore or isolation membrane) that increases in length (27). Phagophore membranes grow and eventually join ends to form a closed compartment called an autophagosome (Fig. 4E). These structures were not found in the negative control (Fig. 4G).

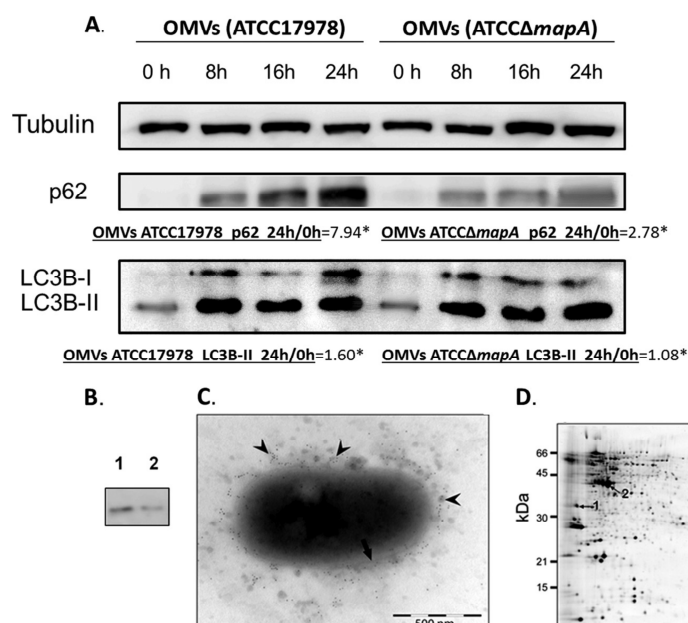
(iii) **Studies with autophagy inhibitors.** As shown Fig. 5A, in wt MEFs there was an increase in the levels of caspase 8 and in two autophagic markers (p62 and LC3B-II), indicating an activation of the apoptosis and a modulation of autophagy, respectively, by Omp 33-36. These markers were studied in both the presence and absence of Omp33-36 and with wortmannin (an inhibitor of PI3K, an enzyme needed for autophagosome formation) and ba-

filomycin (a specific inhibitor of the H<sup>+</sup>-ATPase [V-ATPase] vacuolar type in cells which inhibits the acidification of organelles containing this enzyme, such as lysosomes and endosomes) (Fig. 5B to E). Omp33-36 showed behavior similar to that of the inhibitors: with wortmannin, no autophagosomes were formed (p62 accumulation but no LC3B-II accumulation), while autophagosomes were formed and accumulated in the presence of bafilomycin (p62 and LC3B-II accumulation), as was also observed with the protein Omp33-36 alone (Fig. 5A).

The results obtained by expression studies, immunoblotting, and electron microscopy suggested that in HeLa cells transfected with *mapA*, expression of the protein arrested the process of autophagy. These results support those obtained with the purified protein in the absence and presence of autophagy inhibitors, confirming that the protein blocks autophagy, with the consequent accumulation of autophagosomes (28, 29).

Autophagy enables eukaryotic cells to capture cytoplasmic components for degradation within lysosomes and has classically been studied as a response to several processes, including infectious diseases (30). In this pathway, bacteria that invade the cytoplasm are engulfed and degraded. Pathogens have developed diverse strategies to evade host cell autophagy, so that not only do they escape lysosomal degradation but they also exploit this pathway to their advantage (31). For example, the intracellular patho-





**FIG 7** (A) Blockage of autophagy by OMVs carrying porins (with and without Omp33-36). p62 and LC3B levels of OMVs from *A. baumannii* ATCC 17978 and *A. baumannii* ATCCΔmapA analyzed by Western blotting. \*, densitometry of p62 and LC3B-II at 0 and 24 h from OMVs of *A. baumannii* ATCC 17978 and *A. baumannii* ATCCΔmapA. (B) Confirmation of the presence of the Omp33-36 in OMVs. Pure Omp33-36 (0.3 μg/ml) (lane 1) and 20 μl of OMVs prepared from *A. baumannii* ATCC 17978 (lane 2) were resolved by SDS-PAGE on 12% gels, immunoblotted with a polyclonal antibody against Omp33-36, and visualized with a secondary antibody linked to horseradish peroxidase. A unique band between 43 and 34 kDa (lane 1) was detected. (C) Examination of OMVs by TEM analysis of an *A. baumannii* ATCC 17978 cell. Arrow, bacterial membrane; arrowheads, OMVs released from *A. baumannii*. Omp33-36 was detected with a polyclonal antibody against the protein and a gold-labeled anti-rabbit antibody. (D) Presence of the porins detected by proteomic analysis in the OMVs. The 2-DE gel (IEF) shows *A. baumannii* ATCC 17978 OMV proteins. The numbered spots in the gel indicate the Omp33-36 (spot 1) and OmpA (spot 2) proteins identified by MALDI-TOF/TOF analysis. All gels (12% acrylamide) were silver stained and loaded with 25 μg total protein.

gens *Coxiella burnetii* (32), *Brucella* (33), and *Legionella* (34) modulate both autophagy and apoptosis to establish an intracellular niche in the autophagosomes for cellular replication. Moreover, even *Staphylococcus aureus* (29) and *Serratia marcescens* (35), best known as extracellular pathogens, can induce cell death by intracellular mechanisms. Recently, *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex strains associated with apoptosis in human epithelial cells were shown to induce the formation of autophagic vacuoles, although neither the mechanism nor the bacterial factor involved in this process was explored (36).

The bacterial proteins shown to be involved in the modulation of autophagy by the accumulation of autophagosomes (preventing bacterial degradation) include the virulence factors VirG, VacA, and SipB from, respectively, *Shigella flexneri*, *Helicobacter pylori* (32), and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (37).

**Relationship between apoptosis and autophagy induced by Omp33-36.** The relationship between apoptosis and autophagy induced by Omp33-36 was studied in *bax*<sup>-/-</sup> *bak*<sup>-/-</sup> MEFs or wt MEFs treated with the caspase inhibitor Z-VAD-FMK in the presence of Omp33-36. Both the conversion of LC3B to LC3B-II and p62 degradation occurred (Fig. 6A and B), indicative of the development of autophagy. Finally, when the experiments were performed in autophagy-defective *atg5*<sup>-/-</sup> MEFs (in which no significant conversion of LC3B to LC3B-II or degradation of p62

occurs), incubation with 8 μg Omp33-36/ml still resulted in apoptosis, determined on the basis of the presence of caspase 8 levels similar to those in wild-type cells (Fig. 6C and D).

**ROS production and apoptosis/modulation of autophagy are mediated by Omp33-36.** Challenge of RAW 264.7 macrophages with pure Omp33-36 for 0, 8, 16, and 24 h resulted in a significant ( $P < 0.001$ ) increase in ROS production (Fig. 6E) in negative-control cells incubated with NAC1 (an inhibitor of ROS production) and LDAO buffer.

Finally, caspase 8 levels increased and p62 and LC3B accumulated in the presence of Omp33-36 and ROS inhibitor (NAC1) (Fig. 6F).

Overall, our results show that the Omp33-36 induces apoptosis (by a caspase-dependent mechanism) and modulates autophagy (an increase in LC3BII and the accumulation of p62). When caspase-dependent apoptosis is blocked by chemical inhibitors or in fibroblasts defective in apoptotic activity, the induction of autophagy by Omp33-36 is nonetheless preserved (an increase in LC3B-II and degradation of p62). However, in autophagy-defective fibroblasts, Omp33-36 continues to activate apoptosis, as measured by the maintenance of caspase 8 cleavage.

The relationship between autophagy and apoptosis is complex, as the processes can act synergistically or antagonistically, depending on the cell type, stimulus, and cellular environment (38). For

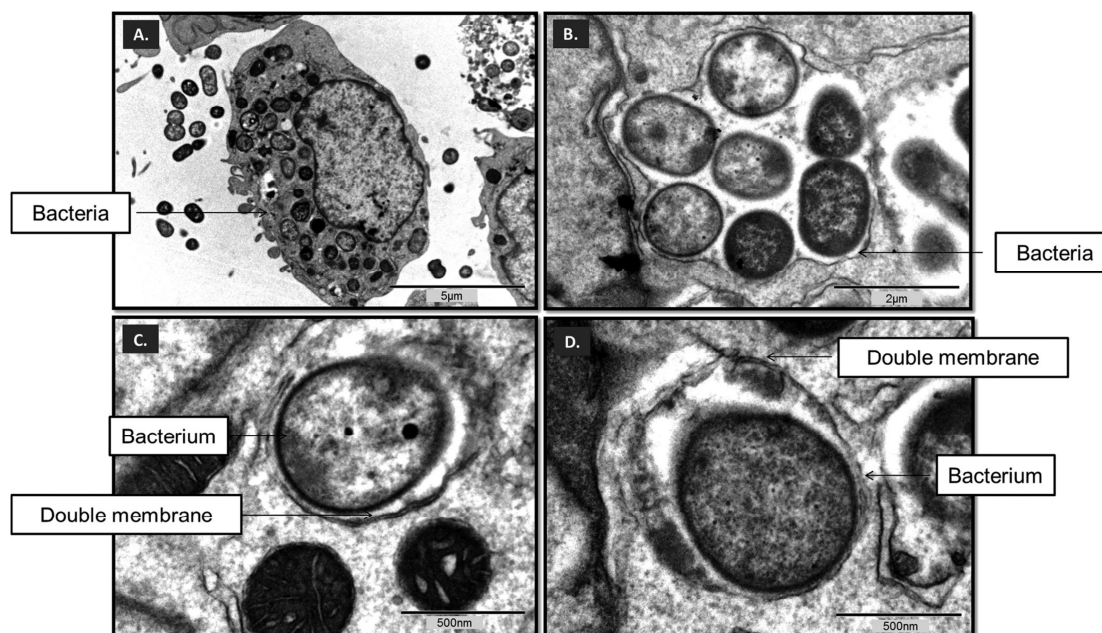


FIG 8 (A to D) Autophagosomes (double-membrane structures) with *A. baumannii* cells replicating within them. (A) TEM of RAW 264.7 macrophages incubated for 12 h with *A. baumannii* ATCC 17978; (B) group of intact bacteria enclosed by double membranes in RAW 264.7 macrophages; (C and D) individual bacterium surrounded by double membranes (arrows) in RAW 264.7 macrophages.

instance, Xi et al. (39) studied the interplay between autophagy and apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells infected with enterovirus 71. These authors observed that caspase 3, a member of the apoptosis cascade, was an important regulator in autophagosome maturation (LC3B conversion) and, thus, in the relationship between autophagy and apoptosis. In rhabdomyosarcoma cells in which the autophagy gene *atg5* was silenced (no LC3B conversion), caspase 3 activation and, thus, apoptosis was also inhibited. However, when caspase 3 was inhibited, ATG5 activity (LC3B conversion) and p62 degradation remained intact, allowing autophagy to proceed.

Finally, evidence from several studies suggests that macrophages produce ROS during microbial attack (40, 41). Our results show that the ROS response is a consequence rather than a cause of activation of apoptosis and modulation of autophagy.

**Omp33-36 as a surface protein on *A. baumannii* cells that is released in OMVs.** OMVs were purified from late-exponential-phase cultures of *A. baumannii* ATCC 17978 and *A. baumannii* ATCCΔ*mapA*, as described in Materials and Methods. The levels of p62 were higher (by almost 8 times, as shown by densitometry studies) in the presence of the OMVs from *A. baumannii* ATCC 17978 than in the presence of OMVs from the mutant *A. baumannii* ATCCΔ*mapA* (Fig. 7A). The level of LC3B-II increased over time in the presence of OMVs from both strains, indicating that the OMVs with Omp33-36 strongly block autophagy. However, there was not an important blockage with the OMV without Omp33-36, but we cannot rule out the possible involvement of other porins.

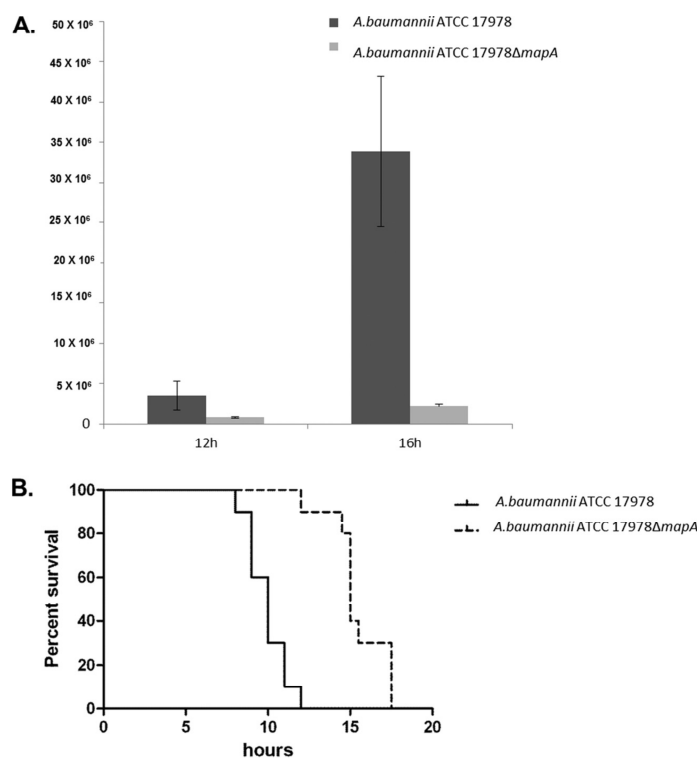
The Western blotting assays used to detect the protein revealed a unique band corresponding to a 33- to 36-kDa protein both in the pure protein and in the OMVs (Fig. 7B, lanes 1 and 2, respectively), which are thus a vehicle for transmission of this protein.

The location of Omp33-36 on the outer membrane suggested that the protein also occurred within the OMVs released by *A. baumannii* and many other Gram-negative bacteria (42, 43). Both the bacterial membrane and the OMVs surrounding the cell were visualized by TEM analysis of *A. baumannii* cells (Fig. 7C). The presence of Omp33-36 in the OMVs was confirmed immunohistochemically with a polyclonal antibody against Omp33-36 and a gold-labeled antirabbit antibody, as described in Materials and Methods.

Proteomic analysis detected Omp33-36 as well as OmpA, a major *A. baumannii* porin that also triggers apoptosis in mammalian cells (44). Purified OMVs were analyzed on a 2-DE gel, and both OmpA and Omp33-36 were identified by MALDI-TOF/TOF analysis (Fig. 7D). These results are consistent with the release of *A. baumannii* outer membrane porins embedded in OMVs, including Omp33-36 and OmpA.

OMVs are natural vehicles for directing bacterial factors into host cells and tissues, as has been described for different bacterial pathogens (45). In addition to secreting a virulence factor that induces cellular apoptosis, Gram-negative bacteria release active toxins associated with OMVs (20, 43, 46). The role of OMVs in the interaction between *A. baumannii* and eukaryotic cells is unclear, although the delivery of bacterial proteins and other bacterial components present in OMVs to eukary-

Rumbo et al.



**FIG 9** (A) Greater intracellular persistence of *A. baumannii* ATCC 17978 (carrying Omp33-36). The numbers of CFU (indicated on the y axis) recovered after infection with *A. baumannii* ATCC 17978 and *A. baumannii* ATCCΔmapA for 12 h and 16 h are shown. (B) Omp33-36 is a virulence factor in animal models. The survival of BALB/c mice ( $n = 10$  per group) following intraperitoneal infection of  $3.5 \times 10^4$  CFU of *A. baumannii* ATCC 17978 or  $4 \times 10^4$  CFU of *A. baumannii* ATCCΔmapA is shown. Survival was significantly higher ( $P < 0.0001$ ) in mice infected with the wild-type strain.

otic cells has been demonstrated (47). The findings of the present study suggest that in *A. baumannii*, OMVs provide a vehicle for the transport of Omp33-36 as well as other porins and virulence factors (44, 48).

***A. baumannii* ATCC 17978 inside autophagosomes.** The interaction between microbes and macrophages was visualized in a TEM study, which showed *A. baumannii* cells persisting within double-membrane structures (i.e., autophagosomes), which is key to the development of infection (Fig. 8).

The efficacy of autophagy in eliminating pathogenic organisms or providing a niche for their replication depends on the nature of the pathogen. A group of intracellular microbes is targeted by autophagy. Avoidance of phagosome maturation is one of the strategies used by a pathogen to enable its replication and intracellular survival within the host cell. Indeed, one of the most remarkable characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* is its ability to control the fate of the bacterium-containing phagosome by blocking its maturation into a degradative compartment (49).

**Impact of *A. baumannii* Omp33-36 on cytotoxicity in macrophages and virulence in a mouse model of systemic infection.** Survival assays were performed to study the persistence and survival of *A. baumannii* in macrophages as well as the role of

Omp33-36 in the process. In RAW 264.7 macrophages incubated for 16 h with *A. baumannii* ATCC 17978 and *A. baumannii* ATCCΔmapA, significantly higher numbers of CFU/ml were recovered from wild-type cells than from the mutants ( $35 \times 10^6$  versus  $3 \times 10^6$  CFU) (Fig. 9A). The experiment could not be carried out for longer than 20 h after infection because the percentage of dead macrophages was much higher in the *A. baumannii* ATCC 17978 infection (62.31%) than in the *A. baumannii* ATCCΔmapA infection (12.65%). These findings suggest the higher cytotoxicity of *A. baumannii* ATCC 17978 expressing Omp33-36 in the macrophage model of infection.

To assess the impact of our findings in a mammalian animal model (Fig. 9B), we determined the virulence of the wild-type (*A. baumannii* ATCC 17978) and mutant (*A. baumannii* ATCCΔmapA) strains in a mouse model of systemic infection. All 10 mice infected with  $3.5 \times 10^4$  CFU of the wild-type strain and 1 of the 10 mice infected with  $4 \times 10^4$  CFU of the ATCCΔmapA mutant strain died within the first 12 h. The remaining mice died within the following 6 h. These data suggest that Omp33-36 participates in the virulence of *A. baumannii* and are consistent with the findings of Smani et al. (10), who concluded that Omp33-36 plays an important role in the fitness and virulence of *A. baumannii*. How-



ever, in that study the molecular mechanisms of cytotoxicity were not further explored.

In summary, in this study we showed the following: (i) Omp33-36 is a porin released within OMVs; (ii) Omp33-36 induces apoptosis through caspase activation and subsequently modulates autophagy, which does not proceed in the absence of apoptosis; (iii) ROS is produced as a consequence of these processes; (iv) *A. baumannii* ATCC 17978 strains (carrying this protein) in macrophage cells persisted intracellularly (inside autophagosomes), causing cytotoxicity; and (v) Omp33-36 is a virulence factor in a systemic model of mouse infection.

Finally, in light of our findings, together with those of Islam and colleagues (50), on the strong immunogenic capacity of Omp33-36, we can recommend this protein as a therapeutic target in the fight against infections caused by *A. baumannii*.

## ACKNOWLEDGMENTS

C. Rumbo was supported by a doctoral grant (PFIS) from the Instituto de Salud Carlos III. M. Tomás is currently the recipient of financial support from the Miguel Servet Programme CHU A Coruña and the Instituto de Salud Carlos III (SERGAS/Ministerio de Sanidad). M. Carvajal was supported by a grant from the Fundación Séneca (Comunidad Autónoma de la Región de Murcia). This work was supported by Magic Bullet (to G. Bou), a project funded by the European Union's Directorate General for Research and Innovation, through the Seventh Framework Program for Research and Development (grant agreement 278232); the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI-RD12/0015); and Spanish Ministry of Health/FEDER funding (ISCIII-FIS PI12/00552 to G. Bou, FIS PI10/00056 and PI13/02390 to M. Tomás).

We thank Catalina Sueiro and Ada Castro for their kind help with microscopic techniques and Bruce Patrick Dos Santos for help in preparing the manuscript.

## REFERENCES

- Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281:1312–1316. <http://dx.doi.org/10.1126/science.281.5381.1312>.
- Komatsu M, Ichimura Y. 2010. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett* 584:1374–1378. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.017>.
- Zhang Y, Goldman S, Baerga R, Zhao Y, Komatsu M, Jin S. 2009. Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:19860–19865. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0906048106>.
- Baumann P. 1968. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J. Bacteriol.* 96:39–42.
- Wong TH, Tan BH, Ling ML, Song C. 2002. Multi-resistant *Acinetobacter baumannii* on a burns unit—clinical risk factors and prognosis. *Burns* 28:349–357. [http://dx.doi.org/10.1016/S0305-4179\(02\)00012-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0305-4179(02)00012-8).
- Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:148–165.
- Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. 2006. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 42:657–668. <http://dx.doi.org/10.1086/499819>.
- Smani Y, Docobo-Perez F, McConnell MJ, Pachon J. 2011. *Acinetobacter baumannii*-induced lung cell death: role of inflammation, oxidative stress and cytosolic calcium. *Microb. Pathog.* 50:224–232. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2011.01.008>.
- Choi CH, Hyun SH, Lee JY, Lee JS, Lee YS, Kim SA, Chae JP, Yoo SM, Lee JC. 2008. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell. Microbiol.* 10:309–319. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01041.x>.
- Smani Y, Domínguez-Herrera J, Pachón J. 2013. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *J. Infect. Dis.* 208:1561–1570. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit386>.
- Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, Kim SA, Lee SK, Lee JC. 2005. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 7:1127–1138. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00538.x>.
- Lee JS, Choi CH, Kim JW, Lee JC. 2010. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A induces dendritic cell death through mitochondrial targeting. *J. Microbiol.* 48:387–392. <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-010-0155-1>.
- del Mar Tomas M, Becceiro A, Perez A, Velasco D, Moure R, Villanueva R, Martinez-Beltran J, Bou G. 2005. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:5172–5175. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.12.5172-5175.2005>.
- Orsel M, Chopin F, Leleu O, Smith SJ, Krapp A, Daniel-Vedele F, Miller AJ. 2006. Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*. Physiology and protein-protein interaction. *Plant Physiol.* 142:1304–1317. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.085209>.
- Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. 1992. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256:385–387. <http://dx.doi.org/10.1126/science.256.5055.385>.
- Rallabhandi P, Awomoyi A, Thomas KE, Phalipon A, Fujimoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Qureshi N, Szein MB, Vogel SN. 2008. Differential activation of human TLR4 by *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* 2a lipopolysaccharide: combined effects of lipid A acylation state and TLR4 polymorphisms on signaling. *J. Immunol.* 180:1139–1147. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.180.2.1139>.
- Arnould D, Bartle LM, Skaletskaya A, Poncet D, Zamzami N, Park PU, Sharpe J, Youle RJ, Goldmacher VS. 2004. Cytomegalovirus cell death suppressor vMIA blocks Bax- but not Bak-mediated apoptosis by binding and sequestering Bax at mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:7988–7993. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0401897101>.
- Aranda J, Poza M, Pardo BG, Rumbo S, Rumbo C, Parreira JR, Rodríguez-Velo P, Bou G. 2010. A rapid and simple method for constructing stable mutants of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol.* 10:279. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-10-279>.
- Hood MI, Jacobs AC, Sayood K, Dunman PM, Skaar EP. 2010. *Acinetobacter baumannii* increases tolerance to antibiotics in response to monovalent cations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:1029–1041. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00963-09>.
- Rumbo C, Fernandez-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC, Mosquera A, Chaves F, Bou G. 2011. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:3084–3090. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00929-10>.
- Maurel C, Reizer J, Schroeder JI, Chrispeels MJ, Saier MH. 1994. Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 269:11869–11872.
- Bay DC, Court DA. 2002. Origami in the outer membrane: the transmembrane arrangement of mitochondrial porins. *Biochem. Cell Biol.* 80:551–562. <http://dx.doi.org/10.1139/o02-149>.
- Takeuchi O, Akira S. 2007. Signaling pathways activated by microorganisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19:185–191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.006>.
- Hornef MW, Henriques-Normark B, Normark S. 2008. The function and biological role of Toll-like receptors in infectious diseases: an update. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21:304–312. <http://dx.doi.org/10.1097/QCO.0b013e3282f88ba3>.
- Boya P, Roques B, Kroemer G. 2001. New EMBO members' review: viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level. *EMBO J.* 20:4325–4331. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/20.16.4325>.
- Moon DC, Gurung M, Lee JH, Lee YS, Choi CW, Kim SI, Lee JC. 2012. Screening of nuclear targeting proteins in *Acinetobacter baumannii* based on nuclear localization signals. *Res. Microbiol.* 163:279–285. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2012.02.001>.
- Tooze SA, Yoshimori T. 2010. The origin of the autophagosomal membrane. *Nat. Cell Biol.* 12:831–835. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb0910-831>.
- Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. 2010. Methods in mammalian

Rumbo et al.

- autophagy research. *Cell* 140:313–326. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.028>.
29. Klionsky DJ, Codogno P. 2013. The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J. Innate Immun.* 5:427–433. <http://dx.doi.org/10.1159/000351979>.
  30. Swanson MS. 2006. Autophagy: eating for good health. *J. Immunol.* 177:4945–4951. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.177.8.4945>.
  31. Campoy E, Colombo MI. 2009. Autophagy in intracellular bacterial infection. *Biochim. Biophys. Acta* 1793:1465–1477. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamer.2009.03.003>.
  32. Lereña MC, Vázquez CL, Colombo MI. 2010. Bacterial pathogens and the autophagic response. *Cell. Microbiol.* 12:10–18. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01403.x>.
  33. Starr T, Child R, Wehrly TD, Hansen B, Hwang S, López-Otin C, Virgin HW, Celli J. 2012. Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell Host Microbe* 11:33–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2011.12.002>.
  34. Colombo MI. 2005. Pathogens and autophagy: subverting to survive. *Cell Death Differ.* 12(Suppl 2):S1481–S1483. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401767>.
  35. Fedrigo GV, Campoy EM, Di Venzio G, Colombo MI, García Vescovi E. 2011. *Serratia marcescens* is able to survive and proliferate in autophagic-like vacuoles inside non-phagocytic cells. *PLoS One* 6:e24054. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024054>.
  36. Krzymińska S, Frąckowiak H, Kaznowski A. 2012. *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex strains induce caspase-dependent and caspase-independent death of human epithelial cells. *Curr. Microbiol.* 65:319–329. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-012-0159-7>.
  37. Hernandez LD, Pyaert M, Flavell RA, Galán JE. 2003. A *Salmonella* protein causes macrophage cell death by inducing autophagy. *J. Cell Biol.* 163:1123–1131. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200309161>.
  38. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y. 2004. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.* 6:1221–1228. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1192>.
  39. Xi X, Zhang X, Wang B, Wang T, Wang J, Huang H, Jin Q, Zhao Z. 2013. The interplays between autophagy and apoptosis induced by enterovirus 71. *PLoS One* 8:e56966. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056966>.
  40. Cosgrove K, Coutts G, Jonsson IM, Tarkowski A, Kokai-Kun JF, Mond JJ, Foster SJ. 2007. Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189:1025–1035. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01524-06>.
  41. Nunoshita T, DeRojas-Walker T, Wishnok JS, Tannenbaum SR, Demple B. 1993. Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:9993–9997. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.21.9993>.
  42. Horstman AL, Kuehn MJ. 2000. Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 275:12489–12496. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.17.12489>.
  43. Kesty NC, Mason KM, Reedy M, Miller SE, Kuehn MJ. 2004. Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *EMBO J.* 23:4538–4549. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600471>.
  44. Jin JS, Kwon SO, Moon DC, Gurung M, Lee JH, Kim SI, Lee JC. 2011. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. *PLoS One* 6:e17027. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017027>.
  45. Kuehn MJ, Kesty NC. 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* 19:2645–2655. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1299905>.
  46. Mendez JA, Soares NC, Mateos J, Gayoso C, Rumbo C, Aranda J, Tomas M, Bou G. 2012. Extracellular proteome of a highly invasive multidrug-resistant clinical strain of *Acinetobacter baumannii*. *J. Proteome Res.* 11:5678–5694. <http://dx.doi.org/10.1021/pr300496c>.
  47. Dupont N, Lacas-Gervais S, Bertout J, Paz I, Freche B, Van Nhieu GT, van der Goot FG, Sansonetti PJ, Lafont F. 2009. *Shigella* phagocytic vacuolar membrane remnants participate in the cellular response to pathogen invasion and are regulated by autophagy. *Cell Host Microbe* 6:137–149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.07.005>.
  48. Beceiro A, Tomas M, Bou G. 2013. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin. Microbiol. Rev.* 26:185–230. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00059-12>.
  49. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. 2004. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 119:753–766. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.038>.
  50. Islam AH, Singh KK, Ismail A. 2011. Demonstration of an outer membrane protein that is antigenically specific for *Acinetobacter baumannii*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 69:38–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.09.008>.

Downloaded from <http://ia.asm.org/> on October 7, 2014 by guest



## 4. DISCUSIÓN

---





## 4. DISCUSIÓN

Tres de los factores que son claves en un microorganismo para su éxito y emergencia como causante de infecciones nosocomiales son la multirresistencia a antibióticos, la transferencia y asimilación de genes de resistencia de una forma eficiente, y la posesión de factores de virulencia que faciliten la infección y permitan la persistencia en el huésped. En la presente tesis doctoral se profundizó en el estudio de estos tres factores en el patógeno humano *A. baumannii*.

En el primer trabajo se analizó el papel de las bombas de expulsión, porinas y  $\beta$ -lactamasas cromosómicas en el fenotipo multirresistente de cepas clínicas de *A. baumannii* y la interrelación que existe entre los diferentes mecanismos que implican estas resistencias. Las cepas clínicas de *A. baumannii* estudiadas poseen sistemas de expulsión y otros mecanismos que probablemente estén conectados. Esto les permite el desarrollo de resistencias a varios antibióticos y, además, parecen estar implicados en otras funciones necesarias para la patogénesis bacteriana.

La transferencia horizontal de estos genes de resistencia es un proceso clave para el éxito del establecimiento de un brote nosocomial, y la eficacia del proceso es esencial para su desarrollo. En el segundo trabajo se describe un nuevo método de transferencia de genes de resistencia a carbapenemas en *A. baumannii*. Este nuevo método, basado en la transferencia mediante OMVs, permite que el material genético esté protegido de la acción de agentes externos y posibilita su distribución a largas distancias, lo cual supone una clara ventaja para su dispersión.

Como ya se ha explicado, las OMVs presentan un gran número de funciones en bacterias gram negativas, entre las que destaca el transporte de factores de virulencia en patógenos. En el tercero de los trabajos se describe como Omp33-36 es un factor de virulencia en *A. baumannii*, capaz de causar

citotoxicidad en células eucariotas mediante activación de la apoptosis y modulación de la autofagia, estando implicada en la persistencia de la bacteria en el huésped. Esta proteína está presente en las OMVs, de forma que éstas actuarían como medio de transporte para su posterior interacción con otros organismos y el medio.

Comprender estos diferentes factores, que hacen de *A. baumannii* una de las bacterias más importantes desde el punto de vista clínico, es clave para combatir sus infecciones y poder desarrollar nuevas terapias contra este microorganismo.

#### 4.1. Discusión artículo I

El impacto de la interacción entre diferentes mecanismos de resistencia antimicrobiana en la susceptibilidad o resistencia a diferentes antibióticos es una cuestión que ha sido abordado en estudios previos. Dos ejemplos de ello son los estudios sobre la cepa clínica de *P. aeruginosa* aislada de pacientes con fibrosis quística (representativa de la cepa epidémica Liverpool) (195) y el otro implica cepas aisladas de infecciones del torrente sanguíneo (196). En nuestro trabajo, se intentó determinar si se podrían aplicar conclusiones similares a las descritas en esos estudios a cepas clínicas de *A. baumannii* en las cuales la resistencia está asociada a mecanismos multifactoriales. Se analizaron cepas de dos clones diferentes, PFGE-ROC-1 y PFGE-HUI-1. Como ya se ha descrito, el clon, PFGE-ROC-1 incluyó 53 cepas portadoras de la  $\beta$ -lactamasa OXA-58 (PFGE-ROC-1<sub>OXA-58</sub>) y 18 cepas portadoras de la  $\beta$ -lactamasa OXA-24 (PFGE-ROC-1<sub>OXA-24</sub>). Las enzimas codificadas por ambos genes muestran una alta prevalencia en aislados de *A. baumannii* obtenidos en la península Ibérica (66, 197). Solo las cepas del clon PFGE-HUI-1 (19 cepas) mostraron susceptibilidad a carbapenemas (184).

La sobreexpresión del sistema AdeABC (ER 30-45 veces) fue significativamente asociado con la resistencia a gentamicina (CMI  $> 8$  mg/L) en cepas PFGE-ROC-1 (la cual produce las  $\beta$ -lactamasas OXA-58 y OXA-24) (81). Además, en cepas de PFGE-ROC-1<sub>OXA-24</sub>, la resistencia a tigeciclina (CMI  $> 0.5$  mg/L) y minociclina (CMI  $> 2$  mg/L) fue significativamente asociada con la expresión de esta bomba de expulsión, como ya ha sido descrito previamente (81). Todas las cepas de PFGE-ROC-1 presentaron mutaciones en los genes *adeR* (Ala<sub>136</sub>→Val) y *adeS* (Ala<sub>94</sub>→Val, Gly<sub>186</sub>→Val y Phe<sub>214</sub>→Leu). Hornsey *et al.* asociaron la sustitución Ala<sub>94</sub>→Val con la sobreexpresión de la bomba de expulsión AdeABC en *A. baumannii* (96, 188). Sin embargo, estudios posteriores no asocian esta mutación con la hiperexpresión de la bomba adeABC (PMID: 23587960). El resto de mutaciones aún no han sido descritas en la literatura. Peleg *et al.* (96) describió que un aumento en la expresión del gen *adeB* (entre 40-54 veces) está asociada con CMI a tigeciclina de 4-16 mg/L en *A.*

*baumannii*. En este estudio se observó que cepas susceptibles a tigeciclina (CMI 0.5) estaban asociadas con un incremento en la expresión del gen *adeB* (alrededor de 20-30 veces), lo cual es indicativo del papel de la bomba AdeABC en otras funciones necesarias para la patogénesis de cepas clínicas de *A. baumannii*, como pueden ser la colonización, la infección y la persistencia del microorganismo en el huésped (198). Por otra parte, no se detectó la bomba AdeABC ni sus genes reguladores en las cepas clínicas del clon PFGE-HUI-1 (susceptible a carbapenemas). Esta bomba está presente en el 80% (desde un 57% a un 97%) de los aislados clínicos estudiados hasta ahora (81).

El incremento de la expresión de la bomba AdeIJK (ER 8-10 veces) fue significativamente asociada con la resistencia a tigeciclina (CMIs > 0.5 mg/L) y minociclina (CMIs > 2 mg/L) en cepas del clon PFGE-ROC-1<sub>OXA-58</sub>. Sin embargo, este sistema no fue significativamente asociado con resistencia a netilmicina o tobramicina (aminoglucósidos). Estos resultados son acordes con los obtenidos por Coyne *et al.* (199). Además, estos autores señalaron que la sobreexpresión de esta bomba es siempre menor que la del sistema AdeABC, lo cual podría confirmar la teoría de que una alta expresión de la bomba AdeIJK es tóxica para la bacteria (85). El gen *adeJ* no fue sobreexpresado en las cepas PFGE-ROC-1<sub>OXA-24</sub> y PFGE-HUI-1. Solo dos cepas del clon PFGE-ROC-1<sub>OXA-58</sub> presentaron dos nuevas mutaciones en los genes reguladores de la bomba AdeIJK (*adeN*; His<sub>111</sub>→Pro; Ile<sub>112</sub>→Phe), mientras que todas las cepas del clon PFGE-HUI-1 presentaron la sustitución Pro<sub>16</sub>→Lys en el gen *adeN*. Ninguna de estas mutaciones fue asociada con la sobreexpresión de AdeIJK. Aun así, otro posible mecanismo de regulación no puede ser descartado (200).

La expresión de los genes *adeG*, *craA*, *abeM*, y *amvA* no se vio incrementada en los clones PFGE-ROC-1 y PFGE-HUI-1 (ER 0.003-1).

Las bacterias gram positivas son el origen de los genes *tet* en gram negativas como *A. baumannii* (94, 95). En este estudio se detectó el gen *tetB* en cepas del clon PFGE-ROC-1, todas ellas resistentes a tetraciclina (CMIs 16-64 mg/mL) y doxiciclina (CMIs 16-64 mg/L). Además, en algunas cepas (PFGE-

ROC-1<sub>OXA-58</sub>) la sobreexpresión de AdelJK junto con la presencia de esta bomba de expulsión adquirida está posiblemente asociada con la resistencia a minociclina (CMI 2 a 4 mg/L). En otros patógenos como *E. coli* la combinación AcrAB-TolC y TetA ha sido asociada con un alto grado de resistencia a tetraciclina (201). Los resultados obtenidos muestran la detección del gen *tetA39* en 33 cepas resistentes a tigeciclina (CMI  $\geq 16$ ). Por otra parte, en las cepas del clon PFGE-HUI-1, portadoras del gen *tetA(39)*, la CMI a tigeciclina fue menor (2 a 1 mg/L) en presencia del inhibidor de bombas de expulsión PAbetaN, de forma que la CMI decreció desde 1 a 0.25 mg/L en las cepas de *A. baumannii* sin este gen. Esto sugiere la implicación de una nueva bomba RND junto con el sistema TetA(39) en la resistencia a tigeciclina.

En relación con las porinas, al contrario de lo que sucede con otros patógenos como *P. aeruginosa* donde la expresión de OprD juega un papel importante en la resistencia a antibióticos carbapenémicos (195), solo se observó una menor ER de los genes *carO* y *omp25* en las cepas del clon PFGE-ROC-1<sub>OXA-24</sub> con respecto a las del clon PFGE-ROC-1<sub>OXA-58</sub>. Esta disminución no fue asociada con la resistencia a carbapenemas, la cual está asociada con la presencia de  $\beta$ -lactamasas (65), pero, en las cepas estudiadas en este trabajo, esta resistencia no es debida a las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas OXA-51 y AmpC, sino que los datos obtenidos revelan que la presencia de enzimas tipo OXA (OXA-24 y OXA-58) es suficiente para conferir resistencia a carbapenemas, como ya fue previamente descrito (66, 197). Además, la resistencia a doripenem fue también asociada con la presencia de las  $\beta$ -lactamasas OXA-58 (CMI 4-5 mg/L) y OXA-24 (CMI 64 a  $>64$  mg/L) (comparado con PFGE-HUI-1, CMI 0.5 a 1 mg/L). Marti *et al.* (202) analizaron la actividad del doripenem en aislados clínicos de *A. baumannii* y concluyeron que el doripenem es más activo que el imipenem y meropenem en cepas portadoras del gen para la  $\beta$ -lactamasa OXA-58. Sin embargo, en este estudio, las CMI para el doripenem, meropenem e imipenem fueron altas en las cepas clínicas productoras de la enzima OXA-24.

La resistencia a quinolonas no varió entre las cepas sujetas al estudio y fue asociada a las mutaciones previamente descritas en los genes *gyrA* y *parC*

(96). Las cepas resistentes a aminoglucósidos mostraron las acetilasas AacC1, AphA1 y AadB en los clones PFGE-ROC-1 y PFGE-HUI-1 (203), todas ellas comunes en las cepas de *A. baumannii*.

## 4.2. Discusión artículo II

Las bacterias gram negativas, tanto las especies patógenas como las no patógenas, secretan OMVs. Estas estructuras son el medio mediante el cual las bacterias interaccionan con otras células, tanto eucariotas como procariotas, en su ambiente (108, 144). La liberación de toxinas mediada por OMVs es un potente mecanismo de virulencia exhibido por diferentes microorganismos gram negativos. Así, proteasas y leucotoxinas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, la toxina Shiga de *E. coli*, VacA de *Helicobacter pylori*, y múltiples factores de virulencia de *P. aeruginosa*, incluyendo  $\beta$ -lactamasas, la fosfatasa alcalina, la fosfolipasa C hemolítica y Cif, se ha visto que pueden ser liberadas a largas distancias por OMVs (155). Por tanto, este mecanismo es, además, un medio efectivo para liberar factores de virulencia.

Además de lípidos y proteínas, se ha observado ADN de doble cadena en las OMVs de las bacterias celulolíticas ruminales del género *Ruminococcus* (113), lo cual podría ser indicativo de que este sistema de transformación puede jugar un papel en la transferencia de genes en un ecosistema microbiano complejo como es el rumen. Por otra parte, se ha descrito la transferencia de genes de virulencia mediada por OMVs de *E. coli* O157:H7 a otras bacterias entéricas, revelándose así que las OMVs pueden actuar como un sistema de transferencia de material genético a otros microorganismos (112). A día de hoy no hay publicaciones sobre la implicación de este sistema en la transferencia de genes de resistencia a carbapenemas o que afecten a microbiota humana.

El ADN puede ser intercambiado entre bacterias por conjugación, transducción o transformación (106). En el presente trabajo, los datos aportados demuestran que cepas clínicas de *A. baumannii* liberan OMVs capaces de transportar el gen de resistencia a carbapenemas *bla*<sub>OXA-24</sub> sin que exista pérdida de viabilidad por parte de los donantes. Se trataría de una posible nueva forma de diseminación de plásmidos portadores de genes de resistencia a antibióticos con gran impacto clínico.

Es importante recordar una serie de características de las OMVs: son producidas por bacterias en crecimiento, y no son producto de la lisis o muerte celular (108). Las cepas patógenas pueden producir entre 10 y 25 veces más OMVs que las cepas no patógenas (108). Bajo condiciones de estrés por falta de oxígeno, *P. aeruginosa* muestra un incremento en la producción de OMVs (204). OMVs procedentes tanto de patógenos intracelulares como extracelulares han sido detectadas en diversos tejidos del huésped, revelando su capacidad para acceder a una gran variedad de ambientes dentro del huésped (205). Por todas estas razones, se podría afirmar que las OMVs son importantes no solo para la virulencia de un patógeno específico en el proceso de infección o interacción con el huésped, sino que, además, durante estos procesos, la liberación de OMVs podría favorecer la propagación de genes de resistencia a antibióticos (como por ejemplo, genes de resistencia a carbapenemas) a las bacterias circundantes. Además, el ADN en el interior de las OMVs está protegido de la acción de nucleasas (como se ha visto en el presente estudio), las cuales pueden estar presentes en el ambiente o en los tejidos del huésped, favoreciéndose así el intercambio de material genético. Por tanto, este sistema, confiere una ventaja adicional para el proceso de diseminación de genes en los microorganismos capaces de liberar OMVs.

El conjunto de datos obtenidos en este estudio proporcionan algunas novedades en el conocimiento del proceso de transferencia horizontal de ADN, al menos en lo que se refiere a *A. baumannii*. Este proceso parece ocurrir continuamente, de forma que una vez que una bacteria es transformada por OMVs, ésta es capaz de liberar a su vez OMVs portadoras del plásmido que previamente ha adquirido.

La presencia de ADN en el interior de las OMVs podría explicarse por dos posibles mecanismos:

- Según Kuehn y Kesty (108), las OMVs contienen lípidos y proteínas procedentes de la membrana externa y del periplasma, estando ausentes moléculas de la membrana interna y del citoplasma. Esto implicaría que



los plásmidos tienen que migrar de alguna manera desde el citoplasma al periplasma, en donde accederían al interior de las OMVs durante su formación.

- Tal y como fue descrito previamente por Kwon *et al.* (206), las OMVs, además, tienen proteínas de la membrana interna. El análisis proteómico de las OMVs de la cepa clínica AbH12O-A2 reveló el típico perfil de la membrana externa, pero además, también fueron identificadas proteínas de membrana interna, representando al menos un 13% de las proteínas totales de las OMVs (207). Estos resultados sugieren que algunas OMVs podrían contener componentes tanto de la membrana externa como de la interna, atrapándose así en su interior componentes citoplasmáticos entre los que podría haber plásmidos, como fue demostrado previamente para otras especies (110).

El proceso de transformación de ADN mediado por OMVs parece ser dosis-independiente, de forma que un incremento en la cantidad de OMVs no produce un incremento en el número de transformantes obtenidos. Por otra parte, la concentración de OMVs encontrada en sobrenadantes procedentes de cultivos es suficiente para mediar la transformación, haciendo que este proceso sea dependiente del tiempo. Una causa que podría explicar este paradójico resultado es que solo una pequeña proporción de la población de OMVs contiene el plásmido, y que ambos tipos de OMVs (con y sin plásmido) compiten para unirse a la bacteria huésped a través de puntos específicos o “puntos calientes”, donde las OMVs se fusionan y liberan el plásmido. De esta forma, un incremento de la cantidad de OMVs incrementará también la proporción de OMVs sin plásmido, por lo que la eficacia de la transformación no se verá aumentada. Por otra parte, la efectividad del proceso se incrementa a lo largo del tiempo, alcanzando un máximo de eficiencia aproximadamente a las 24 horas de incubación.

Un dato interesante a tener en cuenta es que los dos plásmidos clínicos utilizados en este trabajo, pMMA2 y pMMCU3, carecen de la proteína implicada

en la movilización de plásmidos Mob-like, de forma que las OMVs podrían actuar como un mecanismo alternativo para la movilización de plásmidos carentes de esta proteína.

Las carbapenemas son a día de hoy la principal alternativa terapéutica para el tratamiento de las infecciones por *A. baumannii*. Diversos estudios multicéntricos en España han revelado que un 43% de los aislados de *A. baumannii* son resistentes a carbapenemas (208), y que ese 43% porta el gen *bla*<sub>OXA-24</sub> y el 20% el *bla*<sub>OXA-58</sub> (197). Teniendo en cuenta esto, el hecho de que las OMVs secretadas por esta bacteria puedan albergar plásmidos portadores de carbapenemasas es un hecho preocupante y enfatiza la necesidad de llevar a cabo estrictas medidas de control de la infección una vez que cepas de *A. baumannii* productoras de carbapenemasas son detectadas en un hospital.

### 4.3. Discusión artículo III

En este trabajo se demuestra que la proteína Omp33-36 de *A. baumannii*, que actúa como un canal para el agua en la bacteria, es un factor de virulencia capaz de inducir apoptosis y modular el bloqueo de las etapas finales de la autofagia, la cual es un proceso de defensa al que se enfrentan los microorganismos invasores en las células eucariotas (209).

La expresión del gen *mapA* en oocitos de *Xenopus* permitió confirmar que esta proteína actúa como un canal para el agua, confirmando su funcionalidad como una porina en *A. baumannii*. Estos resultados son consistentes con la estructura secundaria de Omp33-36 en barriles beta obtenida mediante dicroísmo circular. Los barriles beta son estructuras secundarias que se encuentran presentes en las porinas bacterianas (193). Las porinas son fundamentales para la supervivencia bacteriana mediando la difusión de sustancias como nutrientes y metabolitos tóxicos. Smani *et al.* (136) demostraron que la pérdida de Omp33-36 estaba asociada con un descenso en la *fitness* en *A. baumannii*, probablemente debido a la reducción de la toma de nutrientes.

Los estudios de muerte celular fueron llevados a cabo con la proteína Omp33-36 purificada y con células HeLa transfectadas con el gen *mapA*. En el proceso de purificación de la proteína, existe la posibilidad de que diferentes contaminantes puedan ser copurificados junto a ella. El LPS y el PGC son, por su abundancia, los contaminantes con mayor probabilidad de ser encontrados en extractos crudos, y son especialmente problemáticos debido a que pueden ser reconocidos por las células eucariotas y disparar reacciones no buscadas (210). La incubación de la proteína Omp33-36 con dos líneas celulares que expresan TLR2 y TLR4 no indujo la liberación de IL-8, lo cual confirma que el proceso de purificación de la proteína fue satisfactorio, indicando que ésta está libre de contaminantes.

Muchas de las características de muerte celular causadas por la proteína Omp33-36 pertenecen al proceso apoptótico: contracción del citoplasma,

condensación del ADN, formación de cuerpos apoptóticos, despolarización mitocondrial, exposición de la anexina, activación de caspasas y fragmentación del ADN. El papel de las porinas bacterianas en el desarrollo de la apoptosis es conocido en varios patógenos (211). Por ejemplo, otra porina de *A. baumannii*, OmpA, que afecta a diferentes orgánulos dentro de la célula eucariota, ha sido descrita como causante de apoptosis en células humanas (131, 132). Sin embargo, existen diferencias importantes entre esta porina y Omp33-36. OmpA causa citotoxicidad al alcanzar el núcleo celular a través de una región específica de señal de localización nuclear (KTKEGRAMNRR) de la cual carece Omp33-36. Por otra parte, se ha descrito que la ausencia de Omp33-36 provoca la sobreexpresión de OmpA (77). Por esta razón, los ensayos en los que se utiliza la cepa de *A. baumannii* deficiente en el gen *mapA* deben ser interpretados cuidadosamente, de forma que no se puede excluir una posible redundancia de la citotoxicidad de las otras porinas.

El bloqueo del flujo de la autofagia en las fases finales del proceso se confirmó mediante la observación del incremento en el número y tamaño de los autofagosomas y por la detección del aumento en el tiempo de los marcadores LC3B-II y p62 (212, 213). Estos resultados fueron, además, confirmados por las células HeLa transfectadas con el gen *mapA*, las cuales aparecían dañadas, (el citoplasma contenía gran cantidad de vacuolas, con material electrondenso en su interior, como las obtenidas con la proteína purificada). Estas características no fueron observadas en los controles negativos (células transfectadas con el plásmido vacío). Estos resultados, junto con los obtenidos con los inhibidores de autofagia, confirman que esta proteína bloquea la autofagia impidiendo la unión autofagosoma-lisosoma, con la consecuente acumulación de autofagosomas (212, 213).

La autofagia permite a las células eucariotas la captura de componentes citoplasmáticos para su degradación en los lisosomas, y ha sido estudiada como respuesta a muchos procesos, incluyendo las enfermedades infecciosas (214). La infección con un microorganismo patógeno puede afectar al proceso autofágico de varias maneras. Por una parte, la autofagia actúa como un método

de defensa implicado en la inmunidad adaptativa. Una vez que el patógeno invade las células, el proceso autofágico puede ser iniciado: el patógeno es englobado en los autofagosomas para ser finalmente degradado por los autolisosomas. Por otra parte, muchos patógenos han desarrollado diferentes estrategias para evadir el proceso, evitando la degradación lisosómica y explotando este proceso en su beneficio (179). *Coxiella burnettii* (215), *Brucella* (216) y *Legionella* (181), son ejemplos de bacterias que producen infecciones intracelulares y modulan la autofagia y la apoptosis con el fin de establecer una infección persistente en la célula. Dos ejemplos de patógenos extracelulares implicados en el desarrollo de muerte celular son *Staphylococcus aureus* (214) y *Serratia marcescens* (217). El primero es capaz de ocasionar infecciones intracelulares y el segundo ha sido recientemente relacionado con la activación del proceso autofágico en el desarrollo de la infección intracelular. Recientemente, se ha descrito que el complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*, que ha sido relacionado con la muerte de células epiteliales a través de apoptosis, forma vacuolas autofágicas en las células infectadas (218). También se han descrito varias proteínas bacterianas implicadas en la modulación de la autofagia que son factores de virulencia, como por ejemplo VirG, VacA y SipB, procedentes respectivamente de *Shigella flexneri*, *Helicobacter pylori* (215), y *Salmonella typhimurium* (219), todos ellos patógenos intracelulares.

La relación entre apoptosis y autofagia es compleja, ya que ambos procesos pueden actuar de forma sinérgica o antagónica dependiendo del tipo celular, los estímulos y el ambiente (220). Xi *et al.* (221) estudiaron la relación entre ambos procesos en células humanas de rhabdomyosarcoma infectadas con enterovirus 71. Observaron que la caspasa 3, miembro de la cascada apoptótica, actúa como un importante regulador de la maduración del autofagosoma (conversión de LC3B), siendo importante en la relación entre autofagia y apoptosis. En células en las que el gen *Atg5* estaba silenciado, (no habría conversión de LC3B), la caspasa 3, al igual que la apoptosis, fueron inhibidas. Sin embargo, cuando la caspasa 3 es inhibida, la conversión de LC3B y la degradación de p62 se mantienen intactas, permitiendo la autofagia.

Por otra parte, evidencias de diferentes estudios sugieren que los macrófagos producen ROS durante el ataque microbiano (222, 223). Nuestros resultados muestran que la liberación de ROS es consecuencia y no causa de la activación de la apoptosis y la modulación de la autofagia.

Las OMVs son el vehículo natural para la liberación de factores bacterianos en las células huésped y en los tejidos, tal y como ha sido descrito para diversos patógenos (108). Además, para secretar factores de virulencia que inducen apoptosis, las bacterias gram negativas liberan toxinas activas asociadas con OMVs (153). No se conoce exactamente el papel de las OMVs en la interacción entre *A. baumannii* y las células eucariotas, aunque se ha demostrado que estas estructuras pueden liberar proteínas y otros componentes bacterianos presentes en su interior a las células eucariotas (224). Los resultados obtenidos demuestran que las OMVs de *A. baumannii* pueden actuar como un vehículo para el transporte tanto de Omp33-36 como de otras porinas (133, 225).

La persistencia observada de *A. baumannii* en el interior de macrófagos, en los autofagosomas, es clave para el desarrollo de la infección. La eficacia de la autofagia para eliminar patógenos o proporcionar un nicho para su replicación depende de la naturaleza del patógeno. El impedimento de la maduración del fagosoma es una de las estrategias usadas por los patógenos para permitir su replicación y supervivencia intracelular en la célula huésped. Así, por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*, tiene la habilidad para controlar la maduración de los fagosomas que contienen bacterias, evitándose así su degradación (177).

Finalmente, los experimentos en modelo murino demuestran que Omp33-36 participa en la virulencia de *A. baumannii* y están en concordancia con los resultados obtenidos por Smani *et al.* (136), quienes concluyeron que Omp33-36 juega un importante papel en la *fitness* y virulencia de *A. baumannii*, aunque en ese estudio el mecanismo molecular de citotoxicidad no fue explorado.

## 5. CONCLUSIONES

---





## 5. CONCLUSIONES

### 5.1. Conclusiones del capítulo I

1. Las cepas clínicas de *A. baumannii* estudiadas poseen sistemas de expulsión y otros mecanismos (posiblemente conectados) que les permiten el desarrollo de resistencia a varios antibióticos y que, además, están implicados en otras funciones necesarias para la patogénesis bacteriana.
2. La sobreexpresión del sistema AdeABC en las cepas clínicas estudiadas está asociado con la resistencia a glicilglicinas (tigeciclina y minociclina) y aminoglucósidos (gentamicina), y posiblemente esté implicada en otras funciones biológicas.
3. La hiperexpresión de la bomba de expulsión AdeIJK en las cepas clínicas estudiadas estuvo significativamente asociada con la resistencia a tigeciclina y minociclina, pero no parece estar implicada en otras funciones relacionadas con la patogénesis de la bacteria. Esta bomba de expulsión podría estar relacionada con el sistema TetB y, por lo tanto, con la resistencia a minociclina.
4. Las porinas y las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas AmpC y OXA-51 en las cepas clínicas estudiadas no están implicadas en la resistencia a antibióticos observada en la presencia de las enzimas tipo OXA (OXA-24 y OXA-58).
5. Las  $\beta$ -lactamasas OXA-24 y OXA-58 están asociadas con la resistencia a meropenem, doripenem e imipenem (especialmente la OXA-24) en las cepas estudiadas.
6. La presencia de bombas de expulsión Tet en las cepas estudiadas está asociada con la resistencia a tetraciclinas y doxiciclina.

7. Una nueva bomba RND podría actuar en combinación con el sistema TetA(39) para proporcionar resistencia a tigeciclina en ausencia de la bomba de expulsión AdeABC y de la sobreexpresión de otros sistemas en las cepas clínicas estudiadas susceptibles a carbapenemas.

## 5.2. Conclusiones del capítulo II

1. *A. baumannii* libera OMVs que contienen el gen *bla*<sub>OXA-24</sub>.
2. Las OMVs son un nuevo mecanismo de dispersión de genes de resistencia a carbapenemas en *A. baumannii*.
3. Es un proceso universal: una vez que una bacteria es transformada, puede liberar OMVs que porten el gen adquirido.

## 5.3. Conclusiones del capítulo III

1. Omp33-36, también denominada Omp34 en algunas especies de *Acinetobacter*, es una porina.
2. Omp33-36 induce apoptosis mediante activación de las caspasas y modula la autofagia, lo cual no ocurre en ausencia de apoptosis.
3. La liberación de ROS se produce como consecuencia de estos procesos.
4. El vehículo de transporte de Omp33-36 son las OMVs de *A. baumannii*.
5. La habilidad de *A. baumannii* de bloquear la autofagia por medio de Omp33-36 permite la persistencia de la bacteria en el interior de los autofagosomas, causando así citotoxicidad.
6. Omp33-36 es un factor de virulencia en un modelo murino de infección sistémica.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---



## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008;21(3):538-82.
2. Barbe V, Vallenet D, Fonknechten N, Kreimeyer A, Oztas S, Labarre L, *et al*. Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. Nucleic Acids Res. 2004;32(19):5766-79.
3. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev. 1996;9(2):148-65.
4. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol. 2007;5(12):939-51.
5. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Diancourt L, van der Reijden TJ, Brisse S, *et al*. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. J Antimicrob Chemother. 62. England. 2008. p. 484-9.
6. Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. J Hosp Infect. 2009;73(4):355-63.
7. Figueiredo S, Bonnin RA, Poirel L, Duranteau J, Nordmann P. Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*. Clin Microbiol Infect. 2012;18(9):907-13.
8. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. J Clin Microbiol. 1997;35(11):2819-25.
9. Baumann P. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. J Bacteriol. 1968;96(1):39-42.
10. Visca P, Seifert H, Towner KJ. *Acinetobacter* infection--an emerging threat to human health. IUBMB Life. 2011;63(12):1048-54.
11. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. Microbes Environ. 2011;26(2):101-12.

12. Carr E, Eason H, Feng S, Hoogenraad A, Croome R, Soddell J, *et al.* RAPD-PCR typing of *Acinetobacter* isolates from activated sludge systems designed to remove phosphorus microbiologically. J Appl Microbiol. 90. England. 2001. p. 309-19.
13. Margesin R, Labbe D, Schinner F, Greer CW, Whyte LG. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. Appl Environ Microbiol. 2003;69(6):3085-92.
14. Wong TH, Tan BH, Ling ML, Song C. Multi-resistant *Acinetobacter baumannii* on a burns unit--clinical risk factors and prognosis. Burns. 2002;28(4):349-57.
15. Roberts SA, Findlay R, Lang SD. Investigation of an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burns unit. J Hosp Infect. 2001;48(3):228-32.
16. Falagas ME, Kopterides P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. J Hosp Infect. 64. England. 2006. p. 7-15.
17. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Jr., Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2006;42(5):657-68.
18. Van Looveren M, Goossens H. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. Clin Microbiol Infect. 2004;10(8):684-704.
19. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. J Clin Microbiol. 2000;38(9):3299-305.
20. Corbella X, Montero A, Pujol M, Dominguez MA, Ayats J, Argerich MJ, *et al.* Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2000;38(11):4086-95.
21. del Mar Tomas M, Cartelle M, Pertega S, Beceiro A, Llinares P, Canle D, *et al.* Hospital outbreak caused by a carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis and risk-factors for colonisation and infection. Clin Microbiol Infect. 2005;11(7):540-6.
22. Maragakis LL, Cosgrove SE, Song X, Kim D, Rosenbaum P, Ciesla N, *et al.* An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* associated with pulsatile lavage wound treatment. Jama. 2004;292(24):3006-11.

23. Garnacho J, Sole-Violan J, Sa-Borges M, Diaz E, Rello J. Clinical impact of pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients: a matched cohort study. *Crit Care Med*. 2003;31(10):2478-82.
24. Lee NY, Lee HC, Ko NY, Chang CM, Shih HI, Wu CJ, *et al*. Clinical and economic impact of multidrug resistance in nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007;28(6):713-9.
25. McConnell MJ, Actis L, Pachon J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev*. 2013;37(2):130-55.
26. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 39. United States. 2004. p. 309-17.
27. Albrecht MC, Griffith ME, Murray CK, Chung KK, Horvath EE, Ward JA, *et al*. Impact of *Acinetobacter* infection on the mortality of burn patients. *J Am Coll Surg*. 2006;203(4):546-50.
28. Gulati S, Kapil A, Das B, Dwivedi SN, Mahapatra AK. Nosocomial infections due to *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ICU. *Neurol India*. 2001;49(2):134-7.
29. Wroblewska MM, Dijkshoorn L, Marchel H, van den Barselaar M, Swoboda-Kopec E, van den Broek PJ, *et al*. Outbreak of nosocomial meningitis caused by *Acinetobacter baumannii* in neurosurgical patients. *J Hosp Infect*. 2004;57(4):300-7.
30. Cascio A, Conti A, Sinardi L, Iaria C, Angileri FF, Stassi G, *et al*. Post-neurosurgical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis successfully treated with intrathecal colistin. A new case and a systematic review of the literature. *Int J Infect Dis*. 2010;14(7):e572-9.
31. Sebeny PJ, Riddle Petersen K, Petersen K. *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. *Clin Infect Dis*. 2008; 47(4):444-9.
32. Schafer JJ, Mangino JE. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* osteomyelitis from Iraq. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(3):512-4.
33. Bhagan-Bruno S, Lather N, Fergus IV. *Acinetobacter* endocarditis presenting as a large right atrial mass: an atypical presentation. *Echocardiography*. 2010;27(4):E39-42.

34. Fagon JY, Chastre J, Domart Y, Trouillet JL, Gibert C. Mortality due to ventilator-associated pneumonia or colonization with *Pseudomonas* or *Acinetobacter* species: assessment by quantitative culture of samples obtained by a protected specimen brush. Clin Infect Dis. 1996;23(3):538-42.
35. Cisneros JM, Reyes MJ, Pachon J, Becerril B, Caballero FJ, Garcia-Garmendia JL, *et al.* Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. Clin Infect Dis. 1996;22(6):1026-32.
36. Jang TN, Lee SH, Huang CH, Lee CL, Chen WY. Risk factors and impact of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections in the adult intensive care unit: a case-control study. J Hosp Infect. 2009;73(2):143-50.
37. Jung JY, Park MS, Kim SE, Park BH, Son JY, Kim EY, *et al.* Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit. BMC Infect Dis. 2010;10:228.
38. Seifert H, Strate A, Pulverer G. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. Medicine (Baltimore). 1995;74(6):340-9.
39. Keen EF 3rd, Robinson BJ, Hospenhal DR, Aldous WK, Wolf SE, Chung KK, *et al.* Prevalence of multidrug-resistant organisms recovered at a military burn center. Burns. 2010;36(6):819-25.
40. Sader HS, Jones RN, Silva JB. Skin and soft tissue infections in Latin American medical centers: four-year assessment of the pathogen frequency and antimicrobial susceptibility patterns. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002;44(3):281-8.
41. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clin Infect Dis. 2005;41(6):848-54.
42. Scott P, Deye G, Srinivasan A, Murray C, Moran K, Hulten E, *et al.* An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. Clin Infect Dis. 2007;44(12):1577-84.
43. Kendirli T, Aydin HI, Hacıhamdioglu D, Gulgun M, Unay B, Akin R, *et al.* Meningitis with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin/sulbactam. J Hosp Infect. 56. England. 2004. p. 328.
44. Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, *et al.* A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. Biochem J. 1991;276 ( Pt 1):269-70.
45. Vila J, Marcos A, Marco F, Abdalla S, Vergara Y, Reig R, *et al.* In vitro antimicrobial production of beta-lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37(1):138-41.



46. Paul G, Joly-Guillou ML, Bergogne-Berezin E, Nevot P, Philippon A. Novel carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase (CARB-5) from *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*. FEMS Microbiol Lett. 1989;50(1-2):45-50.
47. Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A, *et al.* Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(10):2265-9.
48. Pasteran F, Rapoport M, Petroni A, Faccone D, Corso A, Galas M, *et al.* Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* Strains in the Americas. Antimicrob Agents Chemother. 50. United States. 2006. p. 3222-4.
49. Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. J Clin Microbiol. 2003;41(8):3542-7.
50. Huang ZM, Mao PH, Chen Y, Wu L, Wu J. [Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant acinetobacter baumannii]. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. 2004;25(5):425-7.
51. Nagano N, Nagano Y, Cordevant C, Shibata N, Arakawa Y. Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. J Clin Microbiol. 2004;42(9):3978-84.
52. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev. 2005;18(2):306-25.
53. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39(6):1211-33.
54. Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, Palepou MI, Lyon DJ, Woodford N, *et al.* IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(3):710-4.
55. Tysall L, Stockdale MW, Chadwick PR, Palepou MF, Towner KJ, Livermore DM, *et al.* IMP-1 carbapenemase detected in an *Acinetobacter* clinical isolate from the UK. J Antimicrob Chemother. 2002;49(1):217-8.
56. Yum JH, Yi K, Lee H, Yong D, Lee K, Kim JM, *et al.* Molecular characterization of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla(VIM-2)* gene cassettes. J Antimicrob Chemother. 2002;49(5):837-40.

57. Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y. VIM- and IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(7):868-71.
58. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, *et al*. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla(SIM-1)*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(11):4485-91.
59. Bou G, Martinez-Beltran J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(2):428-32.
60. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(10):3471-84.
61. Hujer KM, Hamza NS, Hujer AM, Perez F, Helfand MS, Bethel CR, *et al*. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(7):2941-8.
62. Bonnin RA, Nordmann P, Poirel L. Screening and deciphering antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*: a state of the art. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11(6):571-83.
63. Scaife W, Young HK, Paton RH, Amyes SG. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *J Antimicrob Chemother*. 1995;36(3):585-6.
64. Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(1):196-9.
65. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 12. France 2006. p. 826-36.
66. Merino M, Acosta J, Poza M, Sanz F, Beceiro A, Chaves F, *et al*. OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(6):2724-7.
67. Marque S, Poirel L, Heritier C, Brisse S, Blasco MD, Filip R, *et al*. Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4885-8.

68. Heritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect. 2006;12(2):123-30.
69. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, *et al.* The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett. 258. Netherlands. 2006. p. 72-7.
70. Vila J, Navia M, Ruiz J, Casals C. Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(12):2757-9.
71. Navia MM, Ruiz J, Vila J. Characterization of an integron carrying a new class D beta-lactamase (OXA-37) in *Acinetobacter baumannii*. Microb Drug Resist. 2002;8(4):261-5.
72. Gehrlein M, Leying H, Cullmann W, Wendt S, Opferkuch W. Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. Chemotherapy. 1991;37(6):405-12.
73. Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2003;51(3):565-74.
74. Sato K, Nakae T. Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother. 1991;28(1):35-45.
75. Limansky AS, Mussi MA, Viale AM. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. J Clin Microbiol. 2002;40(12):4776-8.
76. Siroy A, Molle V, Lemaitre-Guillier C, Vallenet D, Pestel-Caron M, Cozzone AJ, *et al.* Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(12):4876-83.
77. del Mar Tomas M, Beceiro A, Perez A, Velasco D, Moure R, Villanueva R, *et al.* Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(12):5172-5.
78. Gribun A, Nitzan Y, Pechatnikov I, Hershkovits G, Katcoff DJ. Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. Curr Microbiol. 2003;47(5):434-43.

79. Vila J, Marti S, Sanchez-Cespedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2007;59(6):1210-5.
80. Smani Y, Fabrega A, Roca I, Sanchez-Encinales V, Vila J, Pachon J. Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(3):1806-8.
81. Coyne S, Courvalin P, Perichon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(3):947-53.
82. Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(9):3298-304.
83. Heritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(8):3198-202.
84. Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of adeB mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2004;54(4):821-3.
85. Damier-Piolle L, Magnet S, Bremont S, Lambert T, Courvalin P. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(2):557-62.
86. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. Clin Infect Dis. 45. United States. 2007. p. 88-94.
87. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(12):3375-80.
88. Su XZ, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. AbeM, an H<sup>+</sup>-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(10):4362-4.
89. Hujer KM, Hujer AM, Endimiani A, Thomson JM, Adams MD, Goglin K, *et al*. Rapid determination of quinolone resistance in *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. 2009;47(5):1436-42.
90. Vila J, Ruiz J, Goni P, Jimenez de Anta T. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 1997;39(6):757-62.

91. Vila J, Ruiz J, Goni P, Marcos A, Jimenez de Anta T. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:1201–3.
92. Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Perichon B. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(10):4389-93.
93. Agerso Y, Guardabassi L. Identification of Tet 39, a novel class of tetracycline resistance determinant in *Acinetobacter* spp. of environmental and clinical origin. *J Antimicrob Chemother*. 55. England. 2005. p. 566-9.
94. Akers KS, Mende K, Yun HC, Hospenthal DR, Beckius ML, Yu X, *et al*. Tetracycline susceptibility testing and resistance genes in isolates of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex from a U.S. military hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(6):2693-5.
95. Ribera A, Ruiz J, Vila J. Presence of the Tet M determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(7):2310-2.
96. Peleg AY, Adams J, Paterson DL. Tigecycline Efflux as a Mechanism for Nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(6):2065-9.
97. Fernandez-Reyes M, Rodriguez-Falcon M, Chiva C, Pachon J, Andreu D, Rivas L. The cost of resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii*: a proteomic perspective. *Proteomics*. 2009;9(6):1632-45.
98. Quinteira S, Grosso F, Ramos H, Peixe L. Molecular epidemiology of imipenem-resistant *Acinetobacter haemolyticus* and *Acinetobacter baumannii* isolates carrying plasmid-mediated OXA-40 from a Portuguese hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(9):3465-6.
99. Valencia R, Arroyo LA, Conde M, Aldana JM, Torres MJ, Fernandez-Cuenca F, *et al*. Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 30. United States. 2009. p. 257-63.
100. Peterson AA, Fesik SW, McGroarty EJ. Decreased binding of antibiotics to lipopolysaccharides from polymyxin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987;31(2):230-7.
101. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, *et al*. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(12):4971-7.

102. Moffatt JH, Harper M, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. Insertion sequence ISAba11 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(6):3022-4.
103. Henry R, Vithanage N, Harrison P, Seemann T, Coutts S, Moffatt JH, *et al*. Colistin-resistant, lipopolysaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* responds to lipopolysaccharide loss through increased expression of genes involved in the synthesis and transport of lipoproteins, phospholipids, and poly-beta-1,6-N-acetylglucosamine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(1):59-69.
104. Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, *et al*. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the pmrAB two-component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(7):3370-9.
105. Arroyo LA, Herrera CM, Fernandez L, Hankins JV, Trent MS, Hancock RE. The pmrCAB operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(8):3743-51.
106. Dubnau D. DNA uptake in bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 1999;53:217-44.
107. Furuya EY, Lowy FD. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol*. 4. England. 2006. p. 36-45.
108. Kuehn MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev*. 19. United States. 2005. p. 2645-55.
109. Kulkarni HM, Jagannadham MV. Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiology*. 160: 2014 The Authors.; 2014. p. 2109-21.
110. Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol*. 1995;177(14):3998-4008.
111. Perez-Cruz C, Carrion O, Delgado L, Martinez G, Lopez-Iglesias C, Mercade E. New type of outer membrane vesicle produced by the Gram-negative bacterium *Shewanella vesiculosa* M7T: implications for DNA content. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(6):1874-81.
112. Yaron S, Kolling GL, Simon L, Matthews KR. Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(10):4414-20.



113. Klieve AV, Yokoyama MT, Forster RJ, Ouwerkerk D, Bain PA, Mawhinney EL. Naturally occurring DNA transfer system associated with membrane vesicles in cellulolytic *Ruminococcus* spp. of ruminal origin. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(8):4248-53.
114. Chopade BA, Wise PJ, Towner KJ. Plasmid transfer and behaviour in *Acinetobacter calcoaceticus* EBF65/65. *J Gen Microbiol.* 1985;131(10):2805-11.
115. Herman NJ, Juni E. Isolation and characterization of a generalized transducing bacteriophage for *Acinetobacter*. *J Virol.* 1974;13(1):46-52.
116. Juni E. Interspecies transformation of *Acinetobacter*: genetic evidence for a ubiquitous genus. *J Bacteriol.* 1972;112(2):917-31.
117. Fulsundar S, Harms K, Flaten GE, Johnsen PJ, Chopade BA, Nielsen KM. Gene transfer potential of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baylyi* and effects of stress on vesiculation. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(11):3469-83.
118. Koning RI, de Breij A, Oostergetel GT, Nibbering PH, Koster AJ, Dijkshoorn L. Cryo-electron tomography analysis of membrane vesicles from *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 T. *Res Microbiol.* 164. France: 2013 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS; 2013. p. 397-405.
119. Zhao WH, Hu ZQ. *Acinetobacter*: a potential reservoir and dispenser for beta-lactamases. *Crit Rev Microbiol.* 2012;38(1):30-51.
120. Lee K, Yong D, Jeong SH, Chong Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. *Yonsei Med J.* 2011;52(6):879-91.
121. Ramirez MS, Morales A, Vilacoba E, Marquez C, Centron D. Class 2 integrons dissemination among multidrug resistance (MDR) clones of *Acinetobacter baumannii*. *Curr Microbiol.* 2012;64(3):290-3.
122. Ramirez MS, Pineiro S, Centron D. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(2):699-706.
123. Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 24. United States. 2003. p. 284-95.
124. Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, *et al.* Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect.* 14. France. 2008. p. 49-54.
125. Davey ME, O'Toole G A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):847-67.

126. Rodríguez-Baño J, Marti S, Soto S, Fernandez-Cuenca F, Cisneros JM, Pachon J, *et al.* Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. Clin Microbiol Infect. 14. France. 2008. p. 276-8.
127. Rao RS, Karthika RU, Singh SP, Shashikala P, Kanungo R, Jayachandran S, *et al.* Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Indian J Med Microbiol. 2008;26(4):333-7.
128. Corradino B, Toia F, di Lorenzo S, Cordova A, Moschella F. A difficult case of necrotizing fasciitis caused by *Acinetobacter baumannii*. Int J Low Extrem Wounds. 9. United States. 2010. p. 152-4.
129. Yamamoto S, Okujo N, Sakakibara Y. Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. Arch Microbiol. 1994;162(4):249-54.
130. Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, Lopez-Rojas R, Pachon J, Actis LA. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. Infect Immun. 2012;80(3):1015-24.
131. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, *et al.* Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. Cell Microbiol. 7. England. 2005. p. 1127-38.
132. Choi CH, Hyun SH, Lee JY, Lee JS, Lee YS, Kim SA, *et al.* *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. Cell Microbiol. 10. England. 2008. p. 309-19.
133. Jin JS, Kwon SO, Moon DC, Gurung M, Lee JH, Kim SI, *et al.* *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. PLoS One. 2011;6(2):e17027.
134. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. Infect Immun. 2009;77(8):3150-60.
135. Smani Y, McConnell MJ, Pachon J. Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. PLoS One. 2012;7(4):e33073.
136. Smani Y, Dominguez-Herrera J, Pachon J. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. J Infect Dis. 208. United States. 2013. p. 1561-70.



137. Fernandez-Cuenca F, Smani Y, Gomez-Sanchez MC, Docobo-Perez F, Caballero-Moyano FJ, Dominguez-Herrera J, *et al.* Attenuated virulence of a slow-growing pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* is associated with decreased expression of genes encoding the porins CarO and OprD-like. *Int J Antimicrob Agents*. 38. Netherlands. 2011. p. 548-9.
138. Camarena L, Bruno V, Euskirchen G, Poggio S, Snyder M. Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *PLoS Pathog*. 2010;6(4):e1000834.
139. Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, *et al.* Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect Immun*. 2010;78(5):1952-62.
140. Knapp S, Wieland CW, Florquin S, Pantophlet R, Dijkshoorn L, Tshimbalanga N, *et al.* Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 173. United States. 2006. p. 122-9.
141. Russo TA, Luke NR, Beanan JM, Olson R, Saubaran SL, MacDonald U, *et al.* The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect Immun*. 2010;78(9):3993-4000.
142. Russo TA, MacDonald U, Beanan JM, Olson R, MacDonald IJ, Saubaran SL, *et al.* Penicillin-binding protein 7/8 contributes to the survival of *Acinetobacter baumannii* in vitro and in vivo. *J Infect Dis*. 2009;199(4):513-21.
143. Ernst JD. Bacterial inhibition of phagocytosis. *Cell Microbiol*. 2. England. 2000. p. 379-86.
144. Mashburn LM, Whiteley M. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature*. 437. England. 2005. p. 422-5.
145. Davis JM, Carvalho HM, Rasmussen SB, O'Brien AD. Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis. *Infect Immun*. 2006;74(8):4401-8.
146. Wai SN, Lindmark B, Soderblom T, Takade A, Westermarck M, Oscarsson J, *et al.* Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell*. 115. United States. 2003. p. 25-35.
147. Yonezawa H, Osaki T, Kurata S, Fukuda M, Kawakami H, Ochiai K, *et al.* Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol*. 2009;9:197.
148. Ciofu O, Beveridge TJ, Kadurugamuwa J, Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2000;45(1):9-13.

149. Kolling GL, Matthews KR. Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(5):1843-8.
150. Lai CH, Listgarten MA, Hammond BF. Comparative ultrastructure of leukotoxic and non-leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* 1981;16(4):379-89.
151. Wai SN, Takade A, Amako K. The release of outer membrane vesicles from the strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol.* 1995;39(7):451-6.
152. Dorward DW, Schwan TG, Garon CF. Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood, or tissues from infected ticks, mice, dogs, and humans. *J Clin Microbiol.* 1991;29(6):1162-70.
153. Kesty NC, Mason KM, Reedy M, Miller SE, Kuehn MJ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *EMBO J.* 2004;23(23):4538-49.
154. Keenan JI, Allardyce RA. Iron influences the expression of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicle-associated virulence factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2000;12(12):1267-73.
155. Bomberger JM, Maceachran DP, Coutermarsh BA, Ye S, O'Toole GA, Stanton BA. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS Pathog.* 2009;5(4):e1000382.
156. Ismail S, Hampton MB, Keenan JI. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles modulate proliferation and interleukin-8 production by gastric epithelial cells. *Infect Immun.* 2003;71(10):5670-5.
157. Pettit RK, Judd RC. The interaction of naturally elaborated blebs from serum-susceptible and serum-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* with normal human serum. *Mol Microbiol.* 1992;6(6):729-34.
158. Takeuchi O, Akira S. Signaling pathways activated by microorganisms. *Curr Opin Cell Biol.* 19. United States. 2007. p. 185-91.
159. Labbe K, Saleh M. Cell death in the host response to infection. *Cell Death Differ.* 15. England. 2008. p. 1339-49.
160. Williams GT. Programmed cell death: a fundamental protective response to pathogens. *Trends Microbiol.* 1994;2(12):463-4.
161. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* 1995;267(5203):1445-9.

162. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 88. United States. 1997. p. 355-65.
163. Zychlinsky A, Sansonetti P. Perspectives series: host/pathogen interactions. Apoptosis in bacterial pathogenesis. *J Clin Invest*. 1997;100(3):493-5.
164. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.
165. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol*. 1984;142(1):67-77.
166. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*. 91. United States. 1997. p. 443-6.
167. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281(5381):1312-6.
168. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999;15:269-90.
169. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, *et al*. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 91. United States. 1997. p. 479-89.
170. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*. 1999;274(17):11549-56.
171. Weinrauch Y, Zychlinsky A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol*. 1999;53:155-87.
172. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*. 9. England. 2007. p. 1102-9.
173. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(3):211-6.
174. Hamasaki M, Noda T, Ohsumi Y. The early secretory pathway contributes to autophagy in yeast. *Cell Struct Funct*. 2003;28(1):49-54.
175. Komatsu M, Ichimura Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett*. 584. Netherlands: 2010 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V; 2010. p. 1374-8.

176. Zhang Y, Goldman S, Baerga R, Zhao Y, Komatsu M, Jin S. Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (*atg7*) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(47):19860-5.
177. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell*. 119. United States. 2004. p. 753-66.
178. Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, *et al*. Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science*. 306. United States. 2004. p. 1037-40.
179. Campoy E, Colombo MI. Autophagy in intracellular bacterial infection. *Biochim Biophys Acta*. 1793. Netherlands. 2009. p. 1465-77.
180. Meresse S, Steele-Mortimer O, Moreno E, Desjardins M, Finlay B, Gorvel JP. Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death. *Nat Cell Biol*. 1999;1(7):E183-8.
181. Colombo MI. Pathogens and autophagy: subverting to survive. *Cell Death Differ*. 12 Suppl 2. England. 2005. p. 1481-3.
182. Melendez A, Levine B. Autophagy in *C. elegans*. *WormBook*. 2009:1-26.
183. Brown S, Young HK, Amyes SG. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11(1):15-23.
184. Fernandez-Cuenca F, Tomas-Carmona M, Caballero-Moyano F, Bou G, Martinez-Martinez L, Vila J, *et al*. [In vitro activity of 18 antimicrobial agents against clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: multicenter national study GEIH-REIPI-Ab 2010]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 31. Spain: S.L; 2013. p. 4-9.
185. Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L, Vila J, Roca I. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(11):1097-103.
186. Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys G, *et al*. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol*. 1995;33(1):11-5.
187. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2974-6.

188. Hornsey M, Loman N, Wareham DW, Ellington MJ, Pallen MJ, Turton JF, *et al.* Whole-genome comparison of two *Acinetobacter baumannii* isolates from a single patient, where resistance developed during tigecycline therapy. J Antimicrob Chemother. 66. England. 2011. p. 1499-503.
189. Zhang L, Ding G, Wei L, Pan X, Mei L, Zhang Y, *et al.* Establishment of a novel target-based real-time quantitative PCR method for *Acinetobacter baumannii* detection. Diagn Mol Pathol. 20. United States. 2011. p. 242-8.
190. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, *et al.* Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2005;43(9):4328-35.
191. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995;33(9):2233-9.
192. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(6):1556-61.
193. Bay DC, Court DA. Origami in the outer membrane: the transmembrane arrangement of mitochondrial porins. Biochem Cell Biol. 2002;80(5):551-62.
194. Rallabhandi P, Awomoyi A, Thomas KE, Phalipon A, Fujimoto Y, Fukase K, *et al.* Differential activation of human TLR4 by *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* 2a lipopolysaccharide: combined effects of lipid A acylation state and TLR4 polymorphisms on signaling. J Immunol. 2008;180(2):1139-47.
195. Tomas M, Doumith M, Warner M, Turton JF, Beceiro A, Bou G, *et al.* Efflux pumps, OprD porin, AmpC beta-lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(5):2219-24.
196. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, Macia MD, Rodriguez C, Moya B, *et al.* Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(5):1906-11.
197. Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. Clin Microbiol Infect. 13. France. 2007. p. 1192-8.
198. Martinez JL, Sanchez MB, Martinez-Solano L, Hernandez A, Garmendia L, Fajardo A, *et al.* Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. FEMS Microbiol Rev. 33. England. 2009. p. 430-49.

199. Coyne S, Guigon G, Courvalin P, Perichon B. Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* with a microarray. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):333-40.
200. Rosenfeld N, Bouchier C, Courvalin P, Perichon B. Expression of the resistance-nodulation-cell division pump AdeIJK in *Acinetobacter baumannii* is regulated by AdeN, a TetR-type regulator. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(5):2504-10.
201. de Cristobal RE, Vincent PA, Salomon RA. Multidrug resistance pump AcrAB-TolC is required for high-level, Tet(A)-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 58. England. 2006. p. 31-6.
202. Marti S, Sanchez-Cespedes J, Alba V, Vila J. In vitro activity of doripenem against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 33. Netherlands. 2009. p. 181-2.
203. Asadollahi K, Taherikalani M, Maleki A, Alizadeh E, Valadbaigi H, Soroush S, *et al.* Diversity of aminoglycoside modifying enzyme genes among multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes isolated from nosocomial infections in Tehran hospitals and their association with class 1 integrons. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 58. Hungary. 2011. p. 359-70.
204. Sabra W, Lunsdorf H, Zeng AP. Alterations in the formation of lipopolysaccharide and membrane vesicles on the surface of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under oxygen stress conditions. *Microbiology.* 2003;149(Pt 10):2789-95.
205. Fiocca R, Necchi V, Sommi P, Ricci V, Telford J, Cover TL, *et al.* Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J Pathol.* 188. England: 1999 John Wiley & Sons, Ltd.; 1999. p. 220-6.
206. Kwon SO, Ghoo YS, Lee JC, Kim SI. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol Lett.* 297. England. 2009. p. 150-6.
207. Mendez JA, Soares NC, Mateos J, Gayoso C, Rumbo C, Aranda J, *et al.* Extracellular proteome of a highly invasive multidrug-resistant clinical strain of *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res.* 2012;11(12):5678-94.
208. Cisneros JM, Rodriguez-Baño J, Fernandez-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pascual A, *et al.* Risk-factors for the acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain: a nationwide study. *Clin Microbiol Infect.* 11. France. 2005. p. 874-9.
209. Swanson MS. Autophagy: eating for good health. *J Immunol.* 177. United States. 2006. p. 4945-51.



210. Hornef MW, Henriques-Normark B, Normark S. The function and biological role of toll-like receptors in infectious diseases: an update. *Curr Opin Infect Dis.* 21. United States. 2008. p. 304-12.
211. Boya P, Roques B, Kroemer G. New EMBO members' review: viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level. *EMBO J.* 2001;20(16):4325-31.
212. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 2010;140(3):313-26.
213. Tooze SA, Yoshimori T. The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol.* 12. England. 2010. p. 831-5.
214. Klionsky DJ, Codogno P. The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J Innate Immun.* 5. Switzerland: Basel.; 2013. p. 427-33.
215. Lerena MC, Vazquez CL, Colombo MI. Bacterial pathogens and the autophagic response. *Cell Microbiol.* 12. England. 2010. p. 10-8.
216. Starr T, Child R, Wehrly TD, Hansen B, Hwang S, Lopez-Otin C, *et al.* Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell Host Microbe.* 2012;11(1):33-45.
217. Fedrigo GV, Campoy EM, Di Venzio G, Colombo MI, Garcia Vescovi E. *Serratia marcescens* is able to survive and proliferate in autophagic-like vacuoles inside non-phagocytic cells. *PLoS One.* 2011;6(8):e24054.
218. Krzyminska S, Frackowiak H, Kaznowski A. *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex strains induce caspase-dependent and caspase-independent death of human epithelial cells. *Curr Microbiol.* 2012;65(3):319-29.
219. Hernandez LD, Pypaert M, Flavell RA, Galan JE. A *Salmonella* protein causes macrophage cell death by inducing autophagy. *J Cell Biol.* 2003;163(5):1123-31.
220. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, *et al.* Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol.* 6. England. 2004. p. 1221-8.
221. Xi X, Zhang X, Wang B, Wang T, Wang J, Huang H, *et al.* The interplays between autophagy and apoptosis induced by enterovirus 71. *PLoS One.* 2013;8(2):e56966.

222. Cosgrove K, Coutts G, Jonsson IM, Tarkowski A, Kokai-Kun JF, Mond JJ, *et al.* Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 2007;189(3):1025-35.
223. Nunoshiba T, deRojas-Walker T, Wishnok JS, Tannenbaum SR, Demple B. Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(21):9993-7.
224. Dupont N, Lacas-Gervais S, Bertout J, Paz I, Freche B, Van Nhieu GT, *et al.* Shigella phagocytic vacuolar membrane remnants participate in the cellular response to pathogen invasion and are regulated by autophagy. Cell Host Microbe. 6. United States. 2009. p. 137-49.
225. Beceiro A, Tomas M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? Clin Microbiol Rev. 2013;26(2):185-230.